

AC

[Document name]      Specification

[Title of the Invention]      Trehalose-releasing enzyme, and  
its preparation and uses

[Claims] 1.    A trehalose-releasing enzyme which specifically  
hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the  
remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having  
a trehalose structure as an end unit and having a degree of  
glucose polymerization of 3 or higher.

2.    The enzyme as claimed in claim 1, wherein said  
glycosyl moiety consists of one or more glucose residues.

3.    The enzyme as claimed in claim 1 or 2, which is  
an enzyme derived from a microorganism.

4.    The enzyme as claimed in claim 3, wherein said  
microorganism is a microorganism selected from the group  
consisting of those of the genera *Rhizobium*, *Arthrobacter*,  
*Brevibacterium* and *Micrococcus*.

5.    A trehalose-releasing enzyme having the  
following physicochemical properties:

(1) Action

Specifically hydrolyzing the linkage  
between a trehalose moiety and the  
remaining glycosyl moiety in a non-  
reducing saccharide having a trehalose  
structure as an end unit and having a  
degree of glucose polymerization of 3 or  
higher;

(2) Molecular weight

About 57,000 to 68,000 daltons on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.3 to 4.6 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Optimum temperature

About 35-45° C when incubated at pH 7.0 for 30 min;

(5) Optimum pH

About 6.0-7.5 when incubated at 40° C for 30 min;

(6) Thermal stability

Stable up to a temperature of about 30-45° C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(7) pH Stability

Stable at a pH of about 5.0-10.0 when incubated at 25° C for 16 hours.

6. A trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and has the following one or more partial amino acid sequences selected from the group consisting of:

- (1) leucine-aspartic acid-tryptophan-alanine-glutamic acid-alanine- $X_1$ - $X_2$ -glycine-aspartic acid (where  $X_1$  means serine or alanine, and  $X_2$  means alanine or glutamic acid);
- (2) aspartic acid-glutamic acid-arginine-alanine-valine-histidine-isoleucine-leucine-glutamic acid- $X_3$  (where  $X_3$  means glutamic acid or aspartic acid); and
- (3)  $X_4$ -glycine-glutamic acid-glycine-asparagine-threonine-tryptophan-glycine-aspartic acid-serine (where  $X_4$  means histidine or glutamine).

7. A process for preparing a trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, characterized in that it comprises culturing a microorganism capable of producing said enzyme in a nutrient culture medium to form said enzyme, and recovering the resultant enzyme.

8. The process as claimed in claim 7, wherein said microorganism is a microorganism selected from the group consisting of those of the genera *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* and *Micrococcus*.

9. A microorganism of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130), deposited in Fermentation Research Institute Agency of

Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan, or a microorganism of *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316), deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan, capable of producing a trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

10. Trehalose or saccharide composition containing trehalose, which is obtained by the method comprising:

allowing an enzyme to act on a solution containing a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, said enzyme capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide; and

recovering the resultant trehalose or a saccharide composition containing the trehalose.

11. A method to lower the degree of glucose polymerization of a reducing partial starch hydrolysate without increasing its reducing power, c h a r a c t e r i z e d in that it contains a step of allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose

polymerization of 3 or higher, said enzyme (I) being capable of forming one or more non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide.

12. Trehalose or saccharide composition containing trehalose, which is obtained by the method comprising:

allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, said enzyme (I) being capable of forming one or more non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide(s); and

recovering the resultant trehalose or a saccharide composition containing the trehalose.

13. Trehalose or saccharide composition containing trehalose, which is obtained by the method comprising:

allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial

starch hydrolysates, having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, prepared by partially hydrolyzing starch, said enzyme (I) being capable of forming one or more non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide(s); and

recovering the resultant trehalose or a saccharide composition containing the trehalose.

14. Trehalose with an increased purity, which is obtained by the method comprising:

allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher to form a solution (III) containing trehalose and other concomitant saccharides, said enzyme (I) being capable of forming one or more non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide(s);

subjecting the solution (III) to column chromatography using a column packed with a strong-acid cation-exchange resin; and

recovering the resultant fractions containing trehalose.

15. The trehalose as claimed in claim 12, 13 or 14, which is hydrous- or anhydrous-crystalline trehalose.

16. Trehalose with an increased purity, which is obtained by the method comprising:

(a) allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, said enzyme (I) being capable of forming a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide;

(b) allowing glucoamylase to act on the resultant reaction mixture in the step (a) to form a solution containing trehalose and other concomitant saccharides;

(c) subjecting the solution (III) to column chromatography using a column packed with a strong-acid cation-exchange resin; and

(d) recovering the resultant fractions containing trehalose.

17. A composition comprising trehalose or saccharide composition containing trehalose, wherein said trehalose or saccharide composition is obtained by the method comprising:

allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme (I) together with a trehalose-releasing enzyme (II) to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, said enzyme (I) being capable of forming a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said enzyme (II) being capable of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in said non-reducing saccharide;

recovering the resultant trehalose or a saccharide composition containing the trehalose.

18. The composition as claimed in claim 17, which is a food product, a cosmetic composition or a pharmaceutical composition.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the invention]

The present invention relates to a trehalose-releasing enzyme, and its preparation and uses, more particularly, to a novel trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a glucose polymerization degree of 3 or higher, and to the preparation of the enzyme. The present invention further relates to microorganisms capable of forming the enzyme and trehalose obtained by using the enzyme as well as to



compositions containing the trehalose.

[Prior art]

Trehalose or  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose has been known as a non-reducing saccharide consisting of glucose units. As is described in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol.18, pp.201-225 (1963), published by Academic Press, USA, and *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.56, pp.3,213-3,215 (1990), trehalose widely exists in microorganisms, mushrooms, insects, etc., though the content is relatively low. Trehalose is a non-reducing saccharide, so that it neither reacts with substances containing amino groups such as amino acids and proteins, induces the amino-carbonyl reaction, nor deteriorates amino acid-containing substances. Thus, trehalose would be used without a fear of causing an unsatisfactory browning and deterioration. Because of these, the establishment of the industrial-scale preparation of trehalose has been in great demand.

Conventional preparations of trehalose are, for example, those which are disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.154,485/75 wherein microorganisms are utilized, and reported in Japanese Patent Laid-Open No.216,695/83 wherein maltose is converted into trehalose by using maltose- and trehalose-phosphorylases in combination. The former, however, is not suitable for the industrial-scale preparation because the content of trehalose present in microorganisms used as a starting material is usually lower than 15 w/w % (the wording

"w/w %" is abbreviated as "%" in the specification, unless otherwise specified), on a dry solid basis (d.s.b.), and the extraction and purification steps are complicated. The latter has the following demerits: Since trehalose is formed via glucose-1-phosphate, the concentration of maltose as a substrate could not be set to a satisfactorily high-level; (ii) the enzymatic reaction systems of the phosphorylases are reversible reactions, and their yields of the objective trehalose are relatively low; and (iii) it is substantially difficult to retain their reaction systems stably and to continue their enzymatic reactions smoothly. Thus, these conventional preparations have not been actually used as an industrial-scale preparation.

As regards the preparation of trehalose, it is reported in the column titled "*Oligosaccharides*" in the chapter titled "*Current Status of Starch Application Development and Related Problems*" in "*Food Chemicals*", No.88, pp.67-72 (August, 1992) that "*In spite of a wide applicability of trehalose, the enzymatic preparation via a direct saccharide-transfer reaction or a hydrolytic reaction has been reported to be scientifically almost impossible in this field.*" Thus, the preparation of trehalose by an enzymatic reaction using starch as a material has been deemed to be scientifically very difficult.

It is known that partial starch hydrolysates, prepared from a material starch such as liquefied starch, dextrins and maltooligosaccharides, exhibit a reducing power

owing to their reducing end groups. The reducing power of these reducing partial starch hydrolysates is generally expressed by "Dextrose Equivalent (DE) value", based on a dry weight. It is known that among reducing partial starch hydrolysates those with a relatively-high DE value generally have a relatively-low molecular weight and viscosity, as well as a relatively-high level of sweetness and reactivity, and readily react with substances having amino groups such as amino acids and proteins to cause an unsatisfactory browning, smell and deterioration of their quality.

Since the properties of reducing partial starch hydrolysates are varied dependently on their DE values, the relationship between reducing partial starch hydrolysates and their DE values is significant. It has been even believed impossible to break away the relationship in this field.

The present inventors, however, did change this common sense and succeeded to establish a preparation of trehalose as disclosed in Japanese Patent Application No.362,131/92 wherein trehalose is directly produced from non-reducing partial starch hydrolysates by allowing glucoamylase together with a non-reducing saccharide-forming enzyme capable of forming non-reducing saccharides, having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, prepared from a material starch. Although the preparation of trehalose yields trehalose from non-reducing

partial starch hydrolysates in a yield of about 30% and can be feasible as an industrial-scale preparation, there still remains some fear of resulting in a high production cost in view of the trehalose yield. Therefore, the establishment of a novel preparation of trehalose, which forms trehalose from non-reducing partial starch hydrolysates in an increased yield, is in great demand.

[Object of the invention]

The object of the present invention is to provide a novel preparation of trehalose in a relatively-high yield from relatively-low cost and stably suppliable starch.

[Means to attain the object]

In order to attain the aforementioned object, the present inventors have extensively screened microorganisms capable of producing a novel enzyme which releases trehalose from non-reducing partial starch hydrolysates having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher. As a result, we found that a non-reducing saccharide-forming microorganism of the genus *Rhizobium*, i.e. *Rhizobium* sp. M-11, isolated from a solid, as disclosed in Japanese Patent Application No.362,131/92; and a non-reducing saccharide-forming microorganism of the genus *Arthrobacter*, i.e. *Arthrobacter* sp. Q36, isolated from a soil, as disclosed in Japanese Patent Application No.265,416/93, produces a novel trehalose-releasing enzyme. We also found that the novel trehalose-releasing

enzyme facilitates a reaction to form trehalose in a satisfactorily-high yield when used in combination with a non-reducing saccharide-forming enzyme, and that trehalose is readily prepared by allowing the novel trehalose-releasing enzyme and a non-reducing saccharide-forming enzyme to act on reducing partial starch hydrolysates, and recovering a reaction mixture containing a relatively-high purity trehalose. Thus, we accomplished this invention. We extensively screened microorganisms which produce such a trehalose-releasing enzyme from among known microorganisms. As a result, we found that microorganisms of the genera *Brevibacterium* and *Micrococcus* produce a trehalose-releasing enzyme which forms trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher similarly as the trehalose-releasing enzymes derived from microorganisms of the genera *Rhizobium* and *Arthrobacter*, and accomplished this invention. We also established compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals containing the trehalose prepared by the aforesaid preparation, and accomplished this invention.

The identification test of a microorganism of the genus *Rhizobium*, i.e. "*Rhizobium* sp. M-11" according to the present invention gave the following results. The test was conducted in accordance with the method as described in "*Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei*" (Classification and Identification of Microorganisms), edited by Takeji Hasegawa,

published by Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan  
(1985):

A. Morphology

Characteristics of cells when incubated at 27°C  
in nutrient agar

Usually existing in a rod form of 0.6-0.8x1.0-  
1.5µm;

Existing single but uncommonly existing in a  
serially coupled- or a linked-form;

Exhibiting no polymorphism;

Possessing motility, asporogenicity and  
flagellum;

Non-acid fast;

Gram stain : Negative;

Capsule : Negative;

Metachromatic granule : Positive; and

Accumulating poly-β-hydroxy butyrate.

B. Cultural property

(1) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in nutrient agar plate

Shape : Circular colony having a  
diameter of about 1.5 mm after  
24-hours incubation;

Rim : Entire;

Projection : Plain or hemispherical shape;

Gloss : Positive;

Surface : Smooth;

Color : Creamy and semitransparent colony  
which forms no pink pigment;

- (2) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in agar plate with  
dextrose and trypton

Creamy and semitransparent colony with  
mucoid;

- (3) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in agar plate with yeast  
extract and mannitol

Shape : Circular colony having a  
diameter of about 3 mm after 5-  
days incubation;

Color : Creamy and semitransparent colony  
with mucoid;

- (4) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in agar plate with yeast  
extract, mannitol and congo red

Exhibiting neither a pale pink nor a  
substantial absorption of congo red;

- (5) Growing at 27°C in agar plate with yeast  
extract, mannitol and 2% NaCl;

- (6) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in slant nutrient agar

Growth : Satisfactory;

Shape : Thread-like; and

- (7) Not liquefying gelatin when stab-cultured

at 27°C in nutrient gelatin.

C. Physiological properties

- (1) Reduction of nitrate : Positive;
- (2) Denitrification reaction : Negative;
- (3) Methyl red test : Negative;
- (4) VP-test : Negative;
- (5) Formation of indole : Negative;
- (6) Formation of hydrogen sulfide : Positive;
- (7) Hydrolysis of starch : Negative;
- (8) Utilization of citric acid : Positive;
- (9) Utilization of inorganic nitrogen source:  
Utilizing ammonium salts and nitrates;
- (10) Formation of pigment : Non;
- (11) Urease : Positive;
- (12) Oxidase : Negative;
- (13) Catalase : Positive;
- (14) Growth conditions : Growing at a pH in the  
range of 5.5-9.0 and a temperature in the  
range of 4-35°C;
- (15) Oxygen requirements : Aerobic;
- (16) Utilization of carbon source and acid  
formation



| Carbon source | Utilization | Acid formation |
|---------------|-------------|----------------|
| D-Glucose     | +           | +              |
| D-Galactose   | +           | +              |
| D-Fructose    | +           | +              |
| L-Arabinose   | +           | +              |
| D-Xylose      | +           | +              |
| L-Rhamnose    | +           | +              |
| Maltose       | +           | -              |
| Sucrose       | +           | +              |
| Lactose       | +           | -              |
| Trehalose     | +           | -              |
| Raffinose     | +           | +              |
| Mannitol      | +           | -              |
| Dextrin       | +           | -              |
| Dulcitol      | +           | -              |

(17) Decarboxylase test on amino acid

Negative against L-lysine, L-arginine and L-ornithine;

(18) Utilization of amino acid

Utilizing sodium L-glutamate, sodium L-aspartate, L-histidine and L-proline;

(19) DNase : Negative;

(20) Formation of 3-ketolactose : Negative; and

(21) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA : 61%.

The bacteriological properties were compared with those of known microorganisms with reference to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st edition (1984). As a result, it was revealed that the microorganism was identified as a microorganism of the genus *Rhizobium*. The microorganism is similar to those of the species *Rhizobium meliloti*, but it is distinguishable from them in that it utilizes maltose, lactose and mannitol but forms no acid, and in that it produces both an enzyme, which forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates, and a novel trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide to release the trehalose moiety. No publication has reported such a microorganism having these properties.

The present inventors had named this microorganism "*Rhizobium* sp. M-11", and deposited it on December 24, 1992, in Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan. The deposition of the microorganism was accepted on the same day and has been maintained by the institute under the accession number of FERM BP-4130.

In addition to the above-identified microorganism, other strains of the genus *Rhizobium* and their mutants can be suitably used in the invention as long as they produce the present trehalose-releasing enzyme.

The identification test of a microorganism of the genus *Arthrobacter*, i.e. *Arthrobacter* sp. Q36 according to the present invention gave the following results. The test was conducted in accordance with the method as described in "*Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei*" (Classification and Identification of Microorganisms), edited by Takeji Hasegawa, published by Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan (1985). The results were as follows:

A. Morphology

- (1) Characteristics of cells when incubated at 27  
in nutrient agar

Usually exhibiting a rod form of 0.5-0.7x0.8-  
1.6 $\mu$ m; Existing single;

Exhibiting polymorphism;

Possessing no motility, flagellum and  
asporogenicity;

Non-acid fast;

Gram stain : Positive;

Capsule : Negative; and

- (2) Characteristics of cells when incubated at 27°C  
in EYG agar

Exhibiting a rod-coccus cycle.

B. Cultural property

- (1) Characteristics of colony formed when  
incubated at 27°C in nutrient agar plate

Shape : Circular colony having a

diameter of about 2-2.5mm after  
3-days incubation;

Rim : Entire;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : Moist gloss;

Surface : Smooth;

Color : Semitransparent and white or pale  
yellow;

(2) Characteristics of cells when slant-  
cultured at 27°C in nutrient agar plate

Growth rate : Satisfactory; and

Shape : Thread-like;

(3) Characteristics of cells when slant-  
cultured at 27°C in agar plate containing  
yeast extract and peptone

Growth rate : Satisfactory;

Shape : Thread-like; and

(4) Characteristics of cells when stab-cultured  
at 27°C in bouillon and gelatin

Liquefying bouillon and gelatin.

#### C. Physiological properties

(1) Reduction of nitrate : Positive;

(2) Denitrification reaction : Negative;

(3) Methyl red test : Negative;

(4) VP-test : Positive;

(5) Formation of indole : Negative;

(6) Formation of hydrogen sulfide : Positive;

- (7) Hydrolysis of starch : Negative;
- (8) Hydrolysis of cellulose : Negative;
- (9) Utilization of citric acid : Positive;
- (10) Utilization of inorganic nitrogen source  
Utilizing ammonium salts and nitrates;
- (11) Formation of pigment : Negative;
- (12) Urease : Positive;
- (13) Oxidase : Negative;
- (14) Catalase : Positive;
- (15) Growth conditions : Growing at a pH in the  
range of 5-10 and a temperature in the  
range of 4-37°C;
- (16) Oxygen requirements : Aerobic;
- (17) Utilization of carbon source and acid  
formation

| Carbon source | Utilization | Acid formation |
|---------------|-------------|----------------|
| D-Glucose     | +           | -              |
| D-Galactose   | +           | -              |
| D-Fructose    | +           | -              |
| L-Arabinose   | +           | -              |
| D-Xylose      | +           | -              |
| L-Rhamnose    | +           | -              |
| Maltose       | +           | -              |
| Sucrose       | +           | -              |
| Lactose       | +           | -              |
| Raffinose     | +           | -              |

(Continued)

| Carbon source | Utilization | Acid formation |
|---------------|-------------|----------------|
| Mannitol      | +           | -              |
| Dextrin       | +           | -              |
| Dulcitol      | +           | -              |

(18) Utilization of amino acid

Utilizing sodium L-glutamate, sodium L-asparagine, L-histidine and L-proline;

(19) DNase : Positive;

(20) Formation of 3-ketolactose : Negative;

(21) Major diamino acid of cell wall :

Lysine; and

(22) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA : 63%.

The bacteriological properties were compared with those of known microorganisms with reference to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (1984). As a result, it was revealed that the microorganism was identified as a microorganism of the genus *Arthrobacter*. The microorganism is characteristic in that it produces a non-reducing saccharide-forming enzyme to form non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates, and a novel trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing

saccharide to lease the trehalose moiety. No publication has reported such a microorganism having these properties.

The present inventors had named this microorganism "*Arthrobacter* sp. Q36", and deposited it on June 3, 1993, in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan. The deposition of the microorganism was accepted on the same day and has been maintained by the institute under the accession number of FERM BP-4316.

In addition to the above-mentioned microorganism, other strains of the genus *Arthrobacter* and their mutants can be suitably used in the invention as long as they produce the present trehalose-releasing enzyme which specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in non-reducing partial starch hydrolysates having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

Other microorganisms can be used in the invention as long as they produce the present enzyme. For example, in addition to the above *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130) and *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316), other hitherto known microorganisms such as those of the species *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) and *Micrococcus roseus* (ATCC 186) can be favorably used in the invention.

Any nutrient culture medium can be used in the invention as long as such microorganisms can grow therein and

produce the present trehalose-releasing enzyme: For example, synthetic- and natural-nutrient culture media can be arbitrarily used. Any carbon-containing substance can be used in the invention as a carbon source as long as it is utilized by the microorganisms: Examples of such a carbon source are saccharides such as glucose, fructose, lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, molasses and partial starch hydrolysates; and organic acids such as citric acid and succinic acid. The concentrations of these carbon sources in nutrient culture media are appropriately chosen. For example, in the case of using partial starch hydrolysates, a preferable concentration is usually 20% or lower, more particularly, 5% or lower, d.s.b., in view of the growth and proliferation of the microorganisms. The nitrogen sources usable in the invention are, for example, inorganic nitrogen compounds such as ammonium salts and nitrates; and organic nitrogen-containing substances such as urea, corn steep liquor, casein, peptone, yeast extract and beef extract. The inorganic ingredients usable in the invention are, for example, calcium salts, magnesium salts, potassium salts, sodium salts, phosphates and other salts of manganese, zinc, iron, copper, molybdenum and cobalt. If necessary, amino acids and vitamins can be favorably used.

The microorganisms usable in the invention are cultured under aerobic conditions at a temperature, usually, a temperature in the range of 4-40°C, preferably, a temperature in the range of 20-35°C; and at a pH in the range of 4-10, preferably, a pH in the range of 5-9. The cultivation time



suitably used in the invention is set to a time which is longer than that required for the growth initiation of the microorganisms, preferably, 10-100 hours. The concentration of dissolved oxygen (DO) in nutrient culture media is not specifically restricted, and, usually a DO in the range of 0.5-20 ppm is satisfactory. The concentration of DO can be kept within the range by controlling the aeration rate, stirring nutrient culture media, supplementing oxygen to aeration, and increasing the inner pressure of fermenters. The culture can be carried out batchwise or in continuous manner.

After completion of the culture of microorganisms, the present enzyme is recovered. Inasmuch as the activity of the present enzyme is found in both cells and cell-free supernatants, they can be recovered and used as a crude enzyme. The resultant culture can be used intact as a crude enzyme. Conventional liquid-solid separation methods can be employed in the invention to remove cells from the culture. For example, methods to directly centrifuge the resultant cultures and those to filtrate them with precoat filters or to separate cells by membrane filtration using plate filters or hollow fibers can be suitably used. Cell-free filtrates thus obtained can be used intact as an enzyme solution or they may be concentrated prior to their use. The concentration methods usable in the invention are, for example, salting out using ammonium sulfate, sedimentation using acetone and alcohol, and concentration using membranes such as plate filters and hollow fibers.

Cell-free filtrates and their concentrates can be subjected to conventional immobilization methods. Examples of conventional methods are conjugation methods using ion-exchangers, and covalent linkages and absorptions using resins and membranes, as well as inclusion methods using high-molecular weight substances. Cells separated from the resultant culture can be used as a crude enzyme without any further treatment or may be immobilized prior to their use. For example, the cells are immobilized by mixing them with sodium alginate, and dropping the resultant mixture in calcium chloride solution to gelatinize the drops into granules. The resultant granules can be fixed by using polyethylene imine or glutaraldehyde. Enzyme preparations extracted from cells can be used in the invention as a crude enzyme solution. Clear crude enzyme solutions containing the present enzyme can be obtained by extracting the present enzyme from cells, which were pretreated with ultrasonic, mechanical disruption using glass beads and alumina, french-press disruption, etc., and subjecting the resultant extracts to centrifugation or membrane filtration.

The crude enzyme solutions thus obtained can be used intact or purified by conventional methods prior to their use. For example, a purified enzyme preparation, which exhibits an electrophoretically single band, can be prepared by dialyzing a crude enzyme preparation, which were previously prepared by salting out the crude enzyme cultures with ammonium sulfate and concentrating the resultant, and successively purifying the

dialyzed solution on anion-exchange column chromatography using "DEAE-Toyopearl®", an anion exchanger; hydrophobic column chromatography using "Butyl-Toyopearl®", a hydrophobic resin; and gel filtration chromatography using "Toyopearl® HW-55", a resin for gel filtration, all of which are products of Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The present trehalose-releasing enzyme thus obtained has the following physicochemical properties:

(1) Action

Specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher;

(2) Molecular weight

About 57,000-68,000 daltons on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.3-4.6 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Optimum temperature

About 35-45°C when incubated at pH 7.0 for 30 min;

(5) Optimum pH

About 6.0-7.5 when incubated at 40°C for 30

min;

(6) Thermal stability

Stable up to a temperature of about 30-45°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(7) pH Stability

Stable at a pH of about 5.0-10.0 when incubated at 25°C for 16 hours.

The activity of the present trehalose-releasing enzyme is assayed as follows: One ml of an enzyme solution is added to 4 ml of 1.25 w/v % maltotriosyltrehalose alias  $\alpha$ -maltotetraosyl  $\alpha$ -glucoside in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), and the mixture solution is incubated at 40°C for 30 min. To the resultant reaction mixture is added a copper solution for the Somogyi reaction to suspend the enzymatic reaction, followed by the determination of the reducing power on the Somogyi-Nelson's method. As a control, an enzyme solution, which were preheated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme, is assayed similarly as above. One unit activity of the present enzyme is defined as the amount of enzyme which increases the reducing power of that of one  $\mu$ mole of glucose per minute when assayed with the above-mentioned assay.

Any substance can be used as a substrate for the present enzyme as long as it is a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher: Examples of such a substrate are glycosyltrehaloses such as glucosyltrehalose, maltosyltrehalose, maltotriosyltrehalose,

maltotetraosyltrehalose and maltopentaosyltrehalose which are prepared by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme to act on maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose. In addition to these substrates, relatively-low reducing partial starch hydrolysates, having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, which can be prepared by partially hydrolyzing amylaceous substances such as starch, amylopectin and amylose with amylases or acids can be suitably used in the invention.

Examples of such amylases which partially hydrolyzing starch are  $\alpha$ -amylase, maltopentaose-forming amylase and maltohexaose-forming amylase as disclosed in *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, published by Pergamon Press, Tokyo, Japan (1988). These amylases can be used in combination with debranching enzymes such as pullulanase and isoamylase.

The concentration of the reducing partial starch hydrolysates used as a substrate in the invention is not specifically restricted. The enzymatic reaction according to the present invention proceeds even in a solution containing 0.1% or 50% of a substrate to form trehalose. Suspensions containing insoluble substrates can be used in the invention. The reaction temperature usable in the present enzymatic reaction can be set to a temperature at which the present enzyme is not inactivated, i.e. a temperature up to about 55°C, preferably, a temperature in the range of 40-55°C. The

reaction pH usable in the present enzymatic reaction is set to a pH in the range of 5-10, preferably, a pH in the range of about 6-8. The reaction time usable in the present enzymatic reaction is adequately chosen dependently on the conditions of the enzymatic reaction, and, usually it is in the range of about 0.1-100 hours when the present enzyme is used in an amount of about 0.1-100 units/g substrate, d.s.b.

As regards the yield of trehalose from material substrates, specifically, in the case of preparing trehalose from non-reducing partial starch hydrolysates with a relatively-low DE value, i.e. those with a relatively-high degree of glucose polymerization, the present preparation of trehalose has the advantage of that it increases the yield of trehalose more than that attained by a preparation as disclosed in Japanese Patent Application No.362,131/92 wherein a non-reducing saccharide-forming enzyme and glucoamylase are used in combination. The present preparation, wherein a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme are used in combination, forms trehalose in a high yield of about 60% or higher, while the preparation of the Japanese Patent Application forms trehalose only in a yield of about 30%.

The enzymatic mechanism of the present invention is as follows: A reducing partial starch hydrolysate with a relatively-high degree of glucose polymerization is first converted by a non-reducing saccharide-forming enzyme into one mole of a non-reducing saccharide having a trehalose structure

as an end unit, then the resultant non-reducing saccharide is hydrolyzed by the present trehalose-releasing enzyme into one mole of trehalose and one mole of a reducing partial starch hydrolysate with a degree of glucose polymerization of lower than that of the material reducing partial starch hydrolysate by 2. In the case of that the newly formed reducing partial starch hydrolysate has a degree of glucose polymerization of 3 or higher, it can be further converted into a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit, and then converted into one mole of trehalose and a partial starch hydrolysate by the trehalose-releasing enzyme. Accordingly, repeated enzymatic reactions of the aforesaid non-reducing saccharide-forming enzyme and trehalose-releasing enzyme can form from one mole of a non-reducing partial starch hydrolysate one or more trehalose molecules and a non-reducing partial starch hydrolysate with a degree of glucose polymerization of lower than that of the material partial starch hydrolysate by a 2-fold higher number of that of the formed trehalose molecules.

In the present preparation, a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme can be simultaneously allowed to act on non-reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, or these two enzymes can be successively allowed to act on non-reducing partial starch hydrolysates in this order. In order to more increase the trehalose yield, the resultant reaction mixture can be further

subjected to the action of glucoamylase.

The reaction mixtures thus obtained are in usual manner subjected to filtration and centrifugation to remove insoluble substances, and the resultant solutions are decolorized with an activated charcoal, desalted with ion-exchangers in H- and OH-form, and concentrated into syrupy products. The syrupy products can be arbitrarily dried into powdery products.

If necessary, the powdery products are readily processed into high-purity trehalose products by purifying them with one or more methods, for example, fractionations on ion-exchange column chromatography, column chromatography using an activated charcoal or a silica gel; separations using organic solvents such as alcohol and acetone; and alkaline treatments to decompose and remove the remaining reducing saccharides.

If necessary, the saccharide products containing the trehalose according to the invention can be hydrolyzed by  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase,  $\alpha$ -glucosidase and/or trehalase, or subjected to a saccharide-transfer reaction by using cyclomaltodextrin glucanotransferase and/or glucosyltransferase to control their sweetness and reducing power as well as to reduce their viscosity. Furthermore, the saccharide products can be arbitrarily hydrogenated to convert them into sugar alcohols to eliminate their reducing power. From the resultant products glucose can be removed by using aforesaid purification methods such as ion-exchange column chromatography to prepare high trehalose content fractions. The fractions thus obtained can be readily purified and



concentrated into syrupy products, and, if necessary the syrupy products can be further concentrated into supersaturated solutions and crystallized to obtain hydrous crystalline trehalose or anhydrous crystalline trehalose.

The ion-exchange column chromatographic techniques usable in the invention include, for example, those which employ a strong-acid cation-exchange resin as disclosed in Japanese Patent Laid-Open Nos.23,799/83 and 72,598/83. By using the techniques, concomitant saccharides contained in crude trehalose products can be readily removed to obtain high trehalose content products. In this case, any one of fixed-bed, moving bed and semi-moving methods can be arbitrarily employed.

In order to prepare hydrous crystalline trehalose, an about 65-90% trehalose solution is placed in a crystallizer, and gradually cooled while stirring in the presence of 0.1-20% seed crystal at a temperature of 95°C or lower, preferably, a temperature in the range of 10-90°C, to obtain a massecuite containing hydrous crystalline trehalose. Conventional methods such as separation, block pulverization, fluidized-bed granulation and spray drying can be employed in the invention to prepare from the massecuite hydrous crystalline trehalose or crystalline saccharides containing it.

In the case of separation, massecuites are usually subjected to a basket-type centrifuge to separate hydrous crystalline trehalose from the mother liquor, and, if necessary the hydrous crystalline trehalose is washed by spraying it with

a small amount of cold water to facilitate the preparation of hydrous crystalline trehalose with an increased purity. In the case of spray drying, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by spraying massecuites, having a concentration of 60-85%, d.s.b., and a crystallinity of about 20-60%, d.s.b., from a nozzle by a high-pressure pump; drying the resultants with an about 60-100°C hot air which does not melt the resultant crystalline powders; and aging the resultant powders for about 1-20 hours while blowing thereto an about 30-60°C hot air. In the case of block pulverization, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by allowing massecuites, having a moisture content of about 10-25% and a crystallinity of about 10-60%, d.s.b., to stand for several hours to 3 days or so in order to crystallize and solidify the whole contents into blocks, pulverizing or cutting the resultant blocks, and drying the resultants. Although anhydrous crystalline trehalose can be prepared by drying hydrous crystalline trehalose to convert it into anhydrous form, it is generally prepared by providing a high trehalose content solution with a moisture content less than 10%, placing the solution in a crystallizer, keeping the solution in the presence of a seed crystal at a temperature in the range of 50-160°C, preferably, a temperature in the range of 80-140°C under stirring conditions to obtain a massecuite containing anhydrous crystalline trehalose, and crystallizing and pulverizing the anhydrous crystalline trehalose under dryness and relatively-

high temperature conditions by using conventional methods such as block pulverization, fluidized-bed granulation and spray drying.

The present trehalose thus obtained is stable and substantially free of reducing power, and can be mixed and processed with other materials, specifically, amino acids and amino acid-containing substances such as oligopeptides and proteins without a fear of causing unsatisfactory browning and smell as well as deterioration of the materials. Trehalose per se has a satisfactorily-high quality and sweetness. Since trehalose is readily hydrolyzed by trehalase into glucose units, it is assimilated, absorbed and utilized by living bodies as a caloric source when orally administered. Furthermore, trehalose is not substantially fermented by dental carries-inducing microorganisms, and this renders it useful as a sweetener substantially free of inducing dental caries.

The present trehalose can be prepared into agents, for example, nutritional agents for transfusion and intubation feeding, which are arbitrarily administrable to living bodies and readily metabolized and utilized by the living bodies without a fear of causing toxicity and side effects. Thus, these products can be advantageously used as an energy-supplementing agent for living bodies.

Trehalose is a stable sweetener, and, especially crystalline trehalose is arbitrarily used as a sugar coating agent for tablets when used in combination with a binder such as pullulan, hydroxyethyl starch or polyvinylpyrrolidone. In

addition, trehalose has properties such as osmotic pressure-controlling ability, filler-imparting ability, gloss-imparting ability, moisture-retaining ability, viscosity-imparting ability, substantial no fermentability, ability to prevent retrogradation of gelatinized starch, and ability to prevent crystallization of other saccharides.

Thus, the present trehalose and saccharide composition containing the same can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler in a variety of compositions such as food products, cigarettes, tobaccos, feeds, cosmetics and pharmaceuticals.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same can be used intact as a seasoning for sweetening. If necessary, they can be used together with adequate amounts of one or more other sweeteners, for example, powdered syrup, glucose, fructose, maltose, sucrose, isomerized sugar, honey, maple sugar, erythritol, sorbitol, maltitol, lactitol, dihydrocharcone, stevioside,  $\alpha$ -glycosyl stevioside, rebaudioside, glycyrrhizin, L-aspartyl L-phenylalanine methyl ester, saccharin, glycine and alanine; and/or a filler such as dextrin, starch and lactose.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same in the form of a powder or a crystal can be used intact, or, if necessary they can be mixed with an excipient, filler, diluent and binder and formed into granules, spheres, shot-rods, plates, cubes and tablets, prior to their

use.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same well harmonize with other materials having sour-, acid-, salty-, bitter-, astringent- and delicious-tastes, and have a relatively-high acid tolerance and heat resistance. Thus, they can be favorably used in food products in general as a sweetener, taste-improving agent and quality-improving agent.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same can be used in seasonings such as an amino acid, peptide, soy sauce, powdered soy sauce, "*miso*", "*funmatsu-miso*" (a powdered *miso*), "*moromi*" (a refined sake), "*hishio*" (a refined soy sauce), "*furikake*" (a seasoned fish meal), mayonnaise, dressing, vinegar, "*sanbai-zu*" (a sauce of sugar, soy sauce and vinegar), "*funmatsu-sushi-su*" (powdered vinegar for sushi), "*chuka-no-moto*" (an instant mix for Chinese dish), "*tentsuyu*" (a sauce for Japanese deep-fat fried food), "*mentsuyu*" (a sauce for Japanese vermicelli), sauce, catsup, "*yakiniku-no-tare*" (a sauce for Japanese grilled meat), curry roux, instant stew mix, instant soup mix, "*dashi-no-moto*" (an instant stock mix), nucleic acid condiments, mixed seasoning, "*mirin*" (a sweet sake), "*shin-mirin*" (a synthetic mirin), table sugar and coffee sugar.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same can be also used freely for sweetening "*wagashi*" (Japanese cakes) such as "*senbei*" (a rice cracker),

"*arare-mochi*" (a rice-cake cube), "*okoshi*" (a millet-and-rice cake), "*mochi*" (a rice paste), "*manju*" (a bun with a bean-jam), "*uiro*" (a sweet rice jelly), "*an*" (a bean jam), "*yokan*" (a sweet jelly of beans), "*mizu-yokan*" (a soft adzuki-bean jelly), "*kingyoku*" (a kind of yokan), jelly, pao de Castella and "*amedama*" (a Japanese toffee); confectioneries such as bun, biscuit, cracker, cookie, pie, pudding, butter cream, custard cream, cream puff, waffle, sponge cake, doughnut, chocolate, chewing gum, caramel and candy; frozen desserts such as ice cream and sherbet; syrups such as "*kajitsu-no-syrup-zuke*" (a preserved fruit) and "*korimitsu*" (a sugar syrup for shaved ice); pastes such as flour paste, peanut paste, fruit paste and spread; processed fruits and vegetables such as jam, marmalade, "*syrup-zuke*" (fruit pickles) and "*toka*" (conserves); pickles and pickled products such as "*fukujin-zuke*" (red colored radish pickles), "*bettara-zuke*" (a kind of whole fresh radish pickles), "*senmai-zuke*" (a kind of sliced fresh radish pickles) and "*rakkyo-zuke*" (pickled shallots); premixes for pickles and pickled products such as "*takuan-zuke-no-moto*" (a premix for pickled radish) and "*hakusai-zuke-no-moto*" (a premix for fresh white rape pickles); meat products such as ham and sausage; products of fish meat such as fish ham, fish sausage, "*kamaboko*" (a steamed fish paste), "*chikuwa*" (a kind of fish paste) and "*tempura*" (a Japanese deep-fat fried fish paste); "*chinmi*" (relish) such as "*uni-no-shiokara*" (salted guts of sea

urchin), "*ika-no-shiokara*" (salted guts of squid), "*su-konbu*" (processed tangle), "*saki-surume*" (dried squid strips) and "*fugu-no-mirin-boshi*" (a dried mirin-seasoned swellfish); "*tsukudani*" (foods boiled down in soy sauce) such as those of laver, edible wild plants, dried squid, fish and shellfish; daily dishes such as "*nimame*" (cooked beans), potato salad and "*konbu-maki*" (a tangle roll); milk products; canned and bottled products such as those of meat, fish meat, fruit and vegetable; alcoholic beverages such as synthetic sake, wine and liquors; soft drinks such as coffee, tea, cocoa, juice, carbonated beverage, sour milk beverage and beverage containing a lactic acid bacterium; instant food products such as instant pudding mix, instant hot cake mix and "*sokuseki-shiruco*" (an instant mix of adzuki-bean soup with rice cake) and instant soup mix; and beverages such as baby foods, foods for therapy, and beverages supplemented with nutrition; as well as for improving the tastes and qualities of the aforementioned food-products.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same can be also used in feeds and pet foods for animals such as domestic animals, poultry, honey bees, silk worms and fishes in order to improve their taste preferences. The trehalose and saccharide compositions can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer in other products in paste and liquid form such as a tobacco, cigarette, dentifrice, lipstick, rouge, lip cream, internal medicine, tablet, troche, cod liver oil in the

form of a drop, cachou, oral refrigerant, gargle, cosmetic and pharmaceutical.

The present trehalose and saccharide compositions containing the same can be used as a quality-improving agent and stabilizer for biologically active substances susceptible to loss of their effective ingredients and activities, as well as in health foods and pharmaceutical compositions containing biologically active substances. Examples of such a biologically active substance are lymphokines such as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -interferons, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tumor necrosis factor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), macrophage migration inhibitory factor, colony-stimulating factor, transfer factor and interleukin 2 (IL-2); hormones such as insulin, growth hormone, prolactin, erythropoietin and follicle-stimulating hormone; biological preparations such as BCG vaccine, Japanese encephalitis vaccine, measles vaccine, live polio vaccine, smallpox vaccine, tetanus toxoid, Trimeresurus antitoxin and human immunoglobulin; antibiotics such as penicillin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin and kanamycin sulfate; vitamins such as thiamine, riboflavin, L-ascorbic acid, cod liver oil, carotenoid, ergosterol and tocopherol; enzymes such as lipase, elastase, urokinase, protease,  $\beta$ -amylase, isoamylase, glucanase and lactase; extracts such as ginseng extract, snapping turtle extract, chlorella extract, aloe extract and propolis extract; viable microorganisms such as viruses, lactic acid bacteria and yeasts; and other biologically active substances such as royal



jelly. By using the present trehalose and saccharide compositions containing the same, the aforementioned biologically active substances are readily prepared into health foods and pharmaceutical compositions with a satisfactorily-high stability and quality without a fear of losing or inactivating their effective ingredients and activities.

As described above, the methods to incorporate the present trehalose and saccharide compositions containing the same into the aforementioned substances and compositions include conventional methods, for example, mixing, kneading, dissolving, melting, soaking, permeating, sprinkling, applying, coating, spraying, injecting, crystallizing and solidifying. The trehalose and saccharide compositions containing the same are usually incorporated into the aforementioned substances and compositions in an amount of 0.1% or higher, preferably, one % or higher, d.s.b.

The following experiments explain the production and purification of the present trehalose-releasing enzyme derived from microorganisms of the species *Rhizobium* sp. M-11 and *Arthrobacter* sp. Q36, as well as hitherto known microorganisms:

#### Experiment 1

##### Production of trehalose-releasing enzyme by

##### *Rhizobium* sp. M-11

A liquid nutrient culture medium, consisting of 2.0 w/v % "PINE-DEX #4", a starch product of Matsutani Chemical Ind., Co., Ltd., Kyoto, Japan, 0.5 w/v % peptone, 0.1 w/v %

yeast extract, 0.1 w/v % disodium hydrogenphosphate, 0.1 w/v % potassium hydrogenphosphate and water, was adjusted to pH 7.0. About 100 ml aliquots of the liquid nutrient culture medium were placed in 500-ml Erlenmeyer flasks, autoclaved at 120°C for 20 min to effect sterilization, cooled, inoculated with a seed culture of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130), and incubated at 27°C for 24 hours under stirring conditions of 130rpm. The resultant cultures were pooled and used as a seed culture.

About 20 L of a fresh preparation of the same liquid nutrient culture medium as used in the above culture was placed in a 30-L fermenter, sterilized, cooled to 27°C, inoculated with one w/v % of the seed culture, and incubated for about 72 hours under stirring and aerobic conditions at 27°C and a pH of 6.0-8.0.

The activities of a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme accumulated in the culture were respectively about 1.5 units/ml and about 2 units/ml. A portion of the culture was separated by centrifugation into cells and a supernatant, and the cells were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) to give the same volume of the portion, followed by assaying the enzyme activity of the cell suspension and the supernatant. The activities of the non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme in the cell suspension were respectively about 0.6 units/ml and about 0.8 units/ml, and the culture supernatant contained about 0.9 units/ml of the non-

reducing saccharide-forming enzyme and about 1.2 units/ml of the present trehalose-releasing enzyme.

The assay of the non-reducing saccharide-forming enzyme is as follows: One ml of an enzyme solution is added to 4 ml of 1.25 w/v % maltopentaose in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), and the mixture solution is incubated at 40°C for 10 min and heated at 100°C for 10 min to suspend the enzymatic reaction. The resultant reaction mixture is precisely diluted with a buffer by 10 times, and the reducing power was determined on the Somogyi-Nelson's method. As a control, an enzyme solution, preheated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme, is assayed similarly as above. One unit activity of the non-reducing saccharide-forming enzyme is defined as the amount of enzyme which eliminates the reducing power of that of one  $\mu$ mole of maltopentaose per minute when assayed with the above-mentioned assay.

## Experiment 2

### Purification of enzyme

An about 18 L of a culture obtained by the method in Experiment 1 was treated to disrupt cells with "MINI-RABO", a supper high-pressure cell disrupting apparatus commercialized by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan. The resultant suspension was centrifuged at 10,000rpm for 30 min to obtain an about 16 L supernatant. Ammonium sulfate was added to the supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.2, and the resultant solution was allowed to stand at 4°C for one hour, and centrifuged at

10,000rpm for 30 min to obtain a supernatant.

Ammonium sulfate was added to the resultant supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.6, and the resultant solution was centrifuged at 10,000rpm for 30 min, followed by recovering a precipitate and dissolving it in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). The solution thus obtained was dialyzed against a fresh preparation of the same phosphate buffer for 24 hours, and centrifuged at 10,000rpm for 30 min to remove insoluble substances. Three hundred and sixty ml of the resultant dialyzed solution was divided into 2 portions which were then separately subjected to column chromatography using a column packed with 300 ml of "DEAE-Toyopearl<sup>®</sup>", an ion-exchanger commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The objective non-reducing saccharide-forming enzyme and trehalose-releasing enzyme were adsorbed on the ion-exchanger, and eluted separately from the column with a fresh preparation of the same phosphate buffer supplemented with salt at different salt concentrations. The elution pattern of the column or the column chromatogram was as shown in FIG.1. The non-reducing saccharide-forming enzyme was eluted from the column at a salt concentration of about 0.2 M, while the trehalose-releasing enzyme was eluted from the column at a salt concentration of about 0.3 M. The fractions containing either of the objective enzymes were separately pooled and purified.

The pooled fractions containing the non-reducing saccharide-forming enzyme were dialyzed against a fresh

preparation of the same phosphate buffer supplemented with 2 M ammonium sulfate. The dialyzed solution was centrifuged at 10,000rpm for 30 min to remove insoluble substances, and the resultant supernatant was subjected to hydrophobic column chromatography using a column packed with 300 ml of "Butyl-Toyopearl® 650", a hydrophobic gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. The enzyme adsorbed on the gel was eluted from the column with a linear gradient buffer ranging from 2 M to 0 M, followed by recovering fractions with the enzyme activity. The resultant fractions were subjected to gel filtration chromatography using a column packed with 300 ml of "Toyopearl® HW-55", a resin for gel chromatography commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, followed by recovering fractions with the enzyme activity.

By using the pooled fractions with a trehalose-releasing enzyme activity eluted from the column of "DEAE-Toyopearl®", the fractions were treated similarly as in the purification steps used in the preparation of the non-reducing saccharide-forming enzyme in such a manner that they were dialyzed against a buffer containing 2 M ammonium sulfate, and successively subjected to hydrophobic column chromatography and gel filtration chromatography.

The total enzyme activity, specific activity and yield of the non-reducing saccharide-forming enzyme in each purification step are as shown in Table 1, while those of the trehalose-releasing enzyme are as shown in Table 2.

Table 1

| Purification step                   | Total enzyme*<br>activity (units)<br>(units/mg protein) | Specific<br>activity<br>(units/mg protein) | Yield<br>(%) |
|-------------------------------------|---|--|--------------|
| Material culture                    | 28,500  | -  | 100          |
| Supernatant after cell disruption   | 22,900  | 0.12                                       | 80           |
| Dialyzed solution after salting out | 21,100  | 0.43                                       | 74           |
| Eluate from ion-exchange column     | 15,200  | 6.2  | 53           |
| Eluate from hydrophobic column      | 7,950   | 101  | 28           |
| Eluate after gel filtration column  | 5,980   | 197  | 21           |

Note : The symbol "\*" means a non-reducing saccharide-forming enzyme.

Table 2

| Purification step                   | Total enzyme**<br>activity (units)<br>(units/mg protein) | Specific<br>activity<br>(units/mg protein) | Yield<br>(%) |
|-------------------------------------|--|--|--------------|
| Material culture                    | 37,400   | -  | 100          |
| Supernatant after cell disruption   | 31,500   | 0.17                                       | 84           |
| Dialyzed solution after salting out | 29,200   | 0.60                                       | 78           |
| Eluate from ion-exchange column     | 25,400   | 5.3  | 68           |
| Eluate from hydrophobic column      | 18,700   | 98.5                                       | 50           |
| Eluate from gel filtration column   | 11,600   | 240  | 31           |

Note : The symbol "\*\*" means the present trehalose-releasing enzyme.

The purified enzyme preparations, obtained as an eluate from gel filtration column in Tables 1 and 2, were examined their purity on electrophoresis using 7.5% polyacrylamide gel. As a result, each enzyme preparation was observed as a single protein band, and this meant that it was an electrophoretically-homogeneous preparation with a relatively-high purity.

### Experiment 3

#### Property of trehalose-releasing enzyme

A portion of a purified trehalose-releasing enzyme preparation, obtained by the method in Experiment 2, was subjected to electrophoresis using a gel containing 10% sodium dodecylsulfate polyacrylamide, and determined its molecular weight to be about 57,000-68,000 daltons by comparing it with marker proteins commercialized by Japan Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan.

Another portion of the purified enzyme preparation was subjected to isoelectrophoresis using polyacrylamide gel containing 2 v/v % "AMPHOLINE", an ampholyte commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The resultant gel was sliced into pieces, followed by measuring their pHs and resulting in a pI of the enzyme being about 3.3-4.3.

Effects of temperature and pH on the activity of the present enzyme were studied in accordance with the assay for the enzyme activity. These results were respectively shown in FIG. 2 (effect of temperature) and FIG. 3 (effect of pH). The optimum temperature of the enzyme was about 45°C when incubated

at pH 7.0 for 30 min, and the optimum pH was about 6.0-7.5 when incubated at 40°C for 30 min. The thermal stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers (pH 7.0) for 60 min at different temperatures, cooling the buffers in test tubes with cold water, and determining the remaining enzyme activity in each buffer. The pH stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers having different pHs at 25°C for 16 hours, adjusting the buffers to pH 7, and assaying the remaining enzyme activity in each buffer. The results of the thermal- and pH-stabilities of the enzyme were respectively shown in FIG.s 4 and 5. The enzyme was stable up to a temperature of about 40°C and at a pH of about 5-10.

#### Experiment 4

##### Preparation of trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of 3 or higher

Non-reducing saccharides, having a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of 3 or higher used as a substrate, were prepared according to the method as described in Japanese Patent Application No.362,131/92. To an aqueous solution containing 20% maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose or maltoheptaose as a substrate was added 2 units/g substrate, d.s.b., of a purified enzyme preparation obtained by the method in Experiment 2, and the resultant mixture was subjected to an enzymatic reaction at 40°C and pH 7.0 for 48 hours. The



reaction mixture was heated to inactivate the remaining enzyme, filtered, decolorized, desalted and concentrated to obtain a concentrated saccharide solution which was then column chromatographed by using "XT-1016 (Na<sup>+</sup>-form, polymerization degree of 4%)", an ion-exchanger commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan. In the column chromatography, the ion-exchanger was packed in 3-jacketed stainless-steel columns, having an inner diameter of 2.0 cm and a length of one m, which were then cascaded in series, heated to give the inner column temperature of 55°C, applied with 5 v/v % of the concentrated saccharide solution against the resin while keeping at 55°C, and fed with 55°C hot water at SV (space velocity) of 0.13 to obtain high-purity non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of polymerization of 3 or higher. Among the resultant preparations, a glucosyltrehalose preparation contained glucosyltrehalose with a purity of 97.6%, d.s.b., and the purities of maltosyltrehalose, maltotriosyltrehalose, maltotetraosyl-trehalose and maltopentaosyltrehalose in their high-purity preparations were respectively 98.6%, 99.6%, 98.3% and 98.1%, d.s.b.

An aqueous solution containing 20%, d.s.b., of each one of the above 5 non-reducing saccharide preparations, namely glycosyltrehalose preparations, was prepared, followed by mixing it with 2 units/g substrate, d.s.b., of the purified trehalose-releasing enzyme obtained in Experiment 2, and subjecting the resultant solution to an enzymatic reaction at

40°C and pH 7.0 for 48 hours. The resultant each reaction mixture was desalted, and analyzed for its composition on high-performance liquid chromatography (HPLC) using "WAKOBEADS WB-T-330 column", a column of Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan. As a control, a fresh preparation of the same trehalose-releasing enzyme was allowed to act on maltooligosaccharides such as maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose, and the resultant each reaction mixture was analyzed for its composition on HPLC. The results were as shown in Table 3.

Table 3

| Substrate               | Product                 | Elution time<br>on HPLC (min) | Percentage<br>(%) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Glucosyltrehalose       | Trehalose               | 27.4                          | 17.5              |
|                         | Glucose                 | 33.8                          | 6.5               |
|                         | Glucosyltrehalose       | 23.3                          | 76.0              |
| Maltosyltrehalose       | Trehalose               | 27.4                          | 44.3              |
|                         | Maltose                 | 28.7                          | 44.4              |
|                         | Maltosyltrehalose       | 21.6                          | 11.3              |
| Maltotriosyltrehalose   | Trehalose               | 27.4                          | 39.5              |
|                         | Maltotriose             | 25.9                          | 60.0              |
|                         | Maltotriosyltrehalose   | 19.7                          | 0.5               |
| Maltotetraosyltrehalose | Trehalose               | 27.4                          | 34.2              |
|                         | Maltotetraose           | 24.1                          | 65.5              |
|                         | Maltotetraosyltrehalose | 18.7                          | 0.3               |

(Continued)

| Substrate               | Product                 | Elution time<br>on HPLC (min) | Percentage<br>(%) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Maltopentaosyltrehalose | Trehalose               | 27.4                          | 29.1              |
|                         | Maltopentaose           | 22.6                          | 70.6              |
|                         | Maltopentaosyltrehalose | 17.8                          | 0.3               |
| Maltotriose             | Maltotriose             | 25.9                          | 100               |
| Maltotetraose           | Maltotetraose           | 24.1                          | 100               |
| Maltopentaose           | Maltopentaose           | 22.6                          | 100               |
| Maltohexaose            | Maltohexaose            | 21.8                          | 100               |
| Maltoheptaose           | Maltoheptaose           | 21.0                          | 100               |

The results in Table 3 evidently show that:

1. Trehalose-releasing enzyme according to the present invention specifically hydrolyzes the linkage between a trehalose moiety and a glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher to form trehalose and a non-reducing saccharide having a degree of glucose polymerization of one or more; and
2. Maltooligosaccharides are not hydrolyzed by the present trehalose-releasing enzyme.

From these results, it is confirmed that the trehalose-releasing enzyme according to the present invention is a novel enzyme which has a mechanism of specifically hydrolyzing the linkage between a trehalose moiety and the remaining glycosyl moiety in a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher to release trehalose from the non-reducing saccharide.

In order to purify trehalose in each reaction mixture, the reaction mixture was subjected to column chromatography using a column packed with "XT-1016 (Na<sup>+</sup>-form)", an alkaline-metal strong-acid cation exchange resin commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, followed by recovering fractions containing 97% or higher of trehalose. The fractions were pooled and

concentrated into an about 65% solution, and the concentrate was allowed to stand at 25°C for 2 days to crystallize hydrous crystalline trehalose, followed by separating and drying it *in vacuo* to obtain a high-purity trehalose preparation with a purity of 99% or higher, d.s.b. The yields of trehalose from glucosyltrehalose, maltosyltrehalose, maltotriosyltrehalose, maltotetraosyltrehalose and maltopentaosyltrehalose used as a substrate were respectively 9.5%, 14.9%, 16.0%, 18.5%, and 17.7%, d.s.b. The high-purity trehalose preparations and a commercially available trehalose specimen as a standard were studied on their melting point, heat of fusion, specific rotation, infrared absorption spectrum, powdery x-ray diffraction pattern, and readiness of hydrolysis by a trehalase specimen derived from pig kidney, commercialized by Sigma Chemical Co., St. Louise, USA. As a result, every trehalose preparation showed a melting point of  $97.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , a heat of fusion of  $57.8 \pm 1.2$  kJ/mole and a specific rotation of  $+182 \pm 1.1^\circ$ , and these values well corresponded with those of the standard trehalose specimen, while the infrared absorption spectra and powdery x-ray diffraction patterns of the trehalose preparations also well corresponded with those of the standard trehalose specimen. Similarly as the standard trehalose specimen, the trehalose preparations were decomposed into glucose units.

As evident from these results, it was confirmed that a non-reducing saccharide, which was formed by allowing the

present trehalose-releasing enzyme to act on non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, was trehalose.

#### Experiment 5

##### Preparation of trehalose from non-reducing partial starch hydrolysates

A suspension containing 5% waxy corn starch was gelatinized by heating, adjusted to pH 4.5, heated to 50°C, mixed with 4,000 units/g starch, d.s.b., of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 20 hours. The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 10 min, cooled to 60°C, and subjected to gel filtration column chromatography using a column packed with 750 ml of "Toyopearl® 50S gel", commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, to obtain reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 35-10.

Either of the reducing partial starch hydrolysates thus obtained or maltotriose having a degree of glucose polymerization of 3 as a substrate was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) into a one % solution which was then mixed with 4 units/g substrate, d.s.b., of a purified non-reducing saccharide-forming enzyme and a purified trehalose-releasing enzyme prepared by the method in Experiment 2, and subjected to an enzymatic reaction at 40°C for 24 hours. After completion of the enzymatic reaction, a portion of the

resultant each reaction mixture was desalted and analyzed on HPLC to identify its composition.

The remaining each reaction mixture was heated to 50°C, adjusted to pH 4.5, admixed with 50 units/g substrate, d.s.b., of a glucoamylase specimen commercialized by Seikagaku-Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 24 hours. Similarly as above, a portion of the resultant each reaction mixture was desalted and analyzed on HPLC to analyze its composition. The results were as shown in Table 4.



| Degree of glucose polymerization of reducing partial starch hydrolysate | Reaction product          | Composition (%) |      |
|---|---------------------------|-----------------|------|
|   |                           | A*              | B**  |
| 34.1  | Trehalose                 | 80.8            | 83.5 |
|   | Glucose                   | 0.2             | 16.5 |
|   | Reducing oligosaccharides | 14.4            | 0.0  |
|   | Glycosyltrehalose         | 4.6             | 0.0  |
| 26.2  | Trehalose                 | 79.7            | 82.5 |
|   | Glucose                   | 0.2             | 17.5 |
|   | Reducing oligosaccharides | 15.3            | 0.0  |
|   | Glycosyltrehalose         | 4.8             | 0.0  |
| 18.1  | Trehalose                 | 77.7            | 80.7 |
|   | Glucose                   | 0.2             | 19.3 |
|   | Reducing oligosaccharides | 17.0            | 0.0  |
|   | Glycosyltrehalose         | 5.1             | 0.0  |
| 15.2  | Trehalose                 | 75.0            | 78.5 |
|   | Glucose                   | 0.3             | 21.5 |
|   | Reducing oligosaccharides | 18.6            | 0.0  |
|   | Glycosyltrehalose         | 6.1             | 0.0  |
| 10.0  | Trehalose                 | 66.1            | 70.1 |
|   | Glucose                   | 0.3             | 29.9 |
|   | Reducing oligosaccharides | 27.6            | 0.0  |
|   | Glycosyltrehalose         | 7.7             | 0.0  |
| 3<br>(Maltotriose)  | Trehalose                 | 4.2             | 20.8 |
|   | Glucose                   | 2.1             | 79.2 |
|   | Maltotriose               | 65.0            | 0.0  |
|   | Glucosyltrehalose         | 28.7            | 0.0  |

Note : The symbol "\*" means a composition after enzymatic reaction of a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme, and the symbol "\*\*" means a composition after enzymatic reaction of glucoamylase. In the Table, the wording "Glycosyltrehalose" means non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization degree of 3 or higher.

As is shown in Table 4, in the case of using as a substrate maltotriose having a degree of glucose polymerization of 3, the trehalose yield after enzymatic reaction of a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme was relatively low, i.e. 4.2%, while in the case of using as a substrate partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 10-34.1, the trehalose yield was relatively high. i.e. 66.1-80.8%. It was found that the higher the degree of glucose polymerization of material reducing partial starch hydrolysates, the higher the purity of the resultant trehalose. It was also found that the purity of the resultant trehalose can be more increased by allowing glucoamylase to act on a reaction mixture, prepared by the hydrolysis of reducing partial starch hydrolysates by the two enzymes, to hydrolyze the concomitant non-reducing saccharides, having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, into trehalose and glucose molecules.

#### Experiment 6

##### Maillard reaction

A solution, containing one % of glycine, 10% of a high-purity trehalose preparation with a purity of 99.5%, d.s.b., obtained by the method in Experiment 4, and 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), was kept at 100°C for 90 min, followed by cooling the resultant solution, and determining its absorbance at a wave length of 480 nm in a 1-cm cell. As a control, glucose and maltose were similarly treated as above,

and the resultants were subjected to determination of their absorbances at a wave length of 480 nm. The results were as shown in Table 5.

Table 5

| Saccharide preparation        | Coloration degree<br>(480 nm) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Trehalose (Present invention) | 0.006                         |
| Glucose (Control)             | 1.671                         |
| Maltose (Control)             | 0.926                         |

As evident from the results in Table 5, it was revealed that the trehalose preparation according to the present invention only showed a slight coloration induced by the maillard reaction, i.e. the coloration degree was merely about 0.4-0.6% of those of glucose and maltose.

The results showed that the present trehalose is substantially free from the maillard reaction. Thus, the present trehalose is a saccharide which has a less fear of causing deterioration of amino acids when mixed with them.

#### Experiment 7

##### Utilization test *in vivo*

In accordance with the method as reported by Atsuji et al. in "*Rinsho-Eiyo*", Vol.41, No.2, pp.200-208 (1972), 30 g of the high-purity trehalose preparation with a purity of 99.5%, d.s.b., obtained by the method in Experiment 4 was dissolved in water into 20 w/v % aqueous solution which was then orally administered to 6 healthy male volunteers, 26-, 27-, 28-, 29-, 30- and 31-year-old. The volunteers were collected their blood at a prescribed time interval, and each collected

blood was assayed for its blood sugar- and insulin-levels. As a control, glucose was used. As a result, the trehalose preparation showed the same dynamics as in glucose, i.e. the blood sugar- and insulin-levels showed their maxima at an about 0.5-1 hour after their administrations. It was revealed that the trehalose preparation is readily assimilated, absorbed, metabolized and utilized by the body as an energy source.

#### Experiment 8

##### Acute toxicity test

By using mice, the high-purity trehalose preparation with a purity of 99.5%, d.s.b., obtained by the method in Experiment 4 was orally administered to the mice for its acute toxicity test. As a result, it was revealed that the trehalose preparation is a relatively-low toxic substance and no mouse died even when administered with it in an amount of the highest possible dose. Though not so accurate, the LD<sub>50</sub> of the trehalose preparation was 50 g/kg or higher.

#### Experiment 9

##### Production of trehalose-releasing enzyme by

##### *Arthrobacter* sp. Q36

Similarly as in Experiment 1, a seed culture of *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316) was cultured by a fermenter for about 72 hours in place of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130). The activities of a non-reducing saccharide-forming enzyme and the present trehalose-releasing enzyme in the resultant culture were respectively about 1.3 units/ml and

about 1.8 units/ml. Similarly as in Experiment 1, a cell suspension and a culture supernatant, prepared from the resultant culture, were assayed. The former had an about 0.5 units/ml of non-reducing saccharide-forming activity and an about 0.5 units/ml of trehalose-releasing enzyme, while the latter had an about 0.8 units/ml of non-reducing saccharide-forming enzyme and an about 1.3 units/ml of trehalose-releasing enzyme.

#### Experiment 10

##### Purification of enzyme

By using an about 18 L of a culture obtained by the method in Experiment 9, the formed non-reducing saccharide-forming enzyme was purified similarly as in Experiment 2. The results in each purification step were tabulated in Table 6.

Table 6

| Purification step   | Enzyme*<br>activity | Specific<br>activity<br>(unit) | Yield<br>(%)<br>(units/mg protein) |
|---|---------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Culture   | 23,700              | -                              | 100                                |
| Supernatant after<br>cell disruption                            | 22,400              | 0.15                           | 95                                 |
| Dialyzed solution<br>after salting out<br>with ammonium sulfate | 20,200              | 0.51                           | 85                                 |
| Eluate from ion-<br>exchange column                             | 15,100              | 6.5                            | 64                                 |
| Eluate from<br>hydrophobic column                               | 8,450               | 115                            | 36                                 |

(Continued)

| Purification step                    | Enzyme*<br>activity | Specific<br>activity<br>(unit) | Yield<br>(%)<br>(units/mg protein) |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Eluate from gel<br>filtration column | 6,120               | 217                            | 26                                 |

Note: The symbol "\*" means a non-reducing  
saccharide-forming enzyme.

Table 7

| Purification step   | Enzyme**<br>activity | Specific<br>activity<br>(unit) | Yield<br>(%)<br>(units/mg protein) |
|---|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Culture   | 32,500               | -                              | 100                                |
| Supernatant after<br>cell disruption                            | 30,100               | 0.19                           | 93                                 |
| Dialyzed solution<br>after salting out<br>with ammonium sulfate | 25,400               | 0.72                           | 78                                 |
| Eluate from ion-<br>exchange column                             | 22,700               | 22.3                           | 70                                 |
| Eluate from<br>hydrophobic column                               | 15,200               | 215                            | 47                                 |
| Eluate from gel<br>filtration column                            | 11,600               | 497                            | 36                                 |

Note: The symbol "\*\*" means the present trehalose-  
releasing enzyme.

Purified enzyme preparations of non-reducing  
saccharide-forming enzyme and trehalose-releasing enzyme,  
obtained as the eluates from gel filtration column in Tables  
6 and 7, were studied on the purities of the enzymes by using  
electrophoresis similarly as in Experiment 2. As a result,

they were respectively observed as a single protein band, and this meant that they were relatively-high purity enzyme preparations exhibiting an electrophoretically single band.

#### Experiment 11

##### Property of enzyme

A purified trehalose-releasing enzyme preparation obtained by the method in Experiment 10 was determined its molecular weight on SDS-PAGE to give about 57,000-67,000 daltons. The pI of the enzyme preparation was determined on isoelectrophoresis similarly as in Experiment 3 to give a pI of about 3.6-4.6. The influences of temperature and pH on the enzyme activity, as well as the thermal stability and pH stability, were studied similarly as in Experiment 3. The results of the influence of temperature, influence of pH, thermal stability and pH stability were respectively as shown in FIG.s 6, 7, 8 and 9.

As evident from these FIG.s, the optimum temperature of the enzyme preparation is about 45°C; the optimum pH, about 6.0-7.5; the thermal stability, up to about 45°C; and the pH stability, about 5.0-10.0.

#### Experiment 12

##### Preparation of trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher

By using the purified enzyme preparation obtained by the method in Experiment 10, trehalose was experimentally prepared from non-reducing saccharides having a trehalose



structure and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher according to the methods in Experiment 4. As a result, it was revealed that the enzyme preparation releases trehalose from the non-reducing saccharides similarly as that derived from *Rhizobium* sp. M-11.

### Experiment 13

#### Production and property of trehalose-releasing enzyme from known microorganisms

Among hitherto known microorganisms, those of the species *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) and *Micrococcus roseus* (ATCC 186), which had been confirmed by the present inventors to produce the present trehalose-releasing enzyme, were respectively cultured by a fermenter at 27°C for 72 hours similarly as in Experiment 1. Eighteen L of each resultant culture was subjected to a cell disrupting apparatus and centrifuged to obtain a supernatant which was then successively salted out with ammonium sulfate, dialyzed, and subjected to an ion-exchange column to obtain a partially purified enzyme preparation, followed by studying its properties. The results along with those of *Rhizobium* sp. M-11 and *Arthrobacter* sp. Q36 were tabulated in Table 8.

Table 8

| Microorganism                                   | Enzyme activity<br>of eluate from<br>ion-exchange<br>column (unit) | Optimum<br>temperature<br>( ° C) | Optimum pH    | Thermal<br>stability<br>( ° C) | pH Stability   |
|---|--|----------------------------------|---------------|--------------------------------|----------------|
| <i>Brevibacterium<br/>helvolum</i> (ATCC 11822) | 6,070  | About 40                         | About 6.5-6.8 | Up to<br>about 40              | About 5.5-9.5  |
| <i>Micrococcus<br/>roseus</i> (ATCC 186)        | 3,010  | About 35                         | About 6.8     | Up to<br>about 30              | About 6.5-7.2  |
| <i>Rhizobium</i> sp.<br>M-11 (FERM BP-4130)     | 25,400   | About 45                         | About 6.0-7.5 | Up to<br>about 40              | About 5.0-10.0 |
| <i>Arthrobacter</i> sp.<br>Q36 (FERM BP-4316)   | 22,700   | About 45                         | About 6.0-7.5 | Up to<br>about 45              | About 5.0-10.0 |

In accordance with the method in Experiment 12, trehalose was experimentally prepared from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher. As a result, it was revealed that similarly as the trehalose releasing enzyme from *Rhizobium* sp. M-11, every enzyme preparation forms trehalose from the non-reducing saccharides.

#### Experiment 14

##### Partial amino acid sequence of trehalose-releasing enzyme

#### Experiment 14 (1)

##### Amino acid sequence containing N-terminal

A portion of a purified enzyme preparation derived from *Rhizobium* sp. M-11, obtained by the method in Experiment 2, and a portion of a purified enzyme preparation derived from *Arthrobacter* sp. Q36, obtained by the method in Experiment 10, were dialyzed against distilled water, and about 80µg protein of each resultant preparation was used as a sample for the determination of their amino acid sequences containing their N-terminals. The amino acid sequences were analyzed on "PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A", an apparatus of Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA, to reveal their 10 amino acid residues from their N-terminals. Partial amino acid sequences containing the N-terminals of the enzyme preparations were as shown in Table 9.

Table 9

| Origin  | Partial amino acid sequence containing N-terminal  |
|---|--|
| <i>Rhizobium</i> sp. M-11<br>(FERM BP-4130)   | alanine-lysine-proline-valine-<br>glutamine-glycine-alanine-glycine-<br>arginine-phenylalanine     |
| <i>Arthrobacter</i> sp. Q36<br>(FERM BP-4316) | threonine-proline-threonine-<br>tyrosine-proline-arginine-glutamic<br>acid-arginine-alanine-lysine |

As evident from Table 9, it was revealed that the N-terminal of the enzyme preparation from *Rhizobium* sp. M-11 is alanine which is followed by an amino acid sequence of lysine-proline-valine-glutamine-glycine-alanine-glycine-arginine-phenylalanine. In the case of the enzyme preparation from *Arthrobacter* sp. Q36, the N-terminal is threonine which is followed by an amino acid sequence of proline-threonine-tyrosine-proline-arginine-glutamic acid-arginine-alanine-lysine.

Experiment 14 (2)

Internal partial amino acid sequence

A portion of a purified enzyme preparation derived from *Rhizobium* sp. M-11, obtained by the method in Experiment 2, and a portion of a purified enzyme preparation derived from *Arthrobacter* sp. Q36, obtained by the method in Experiment 10, were dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), and the resultants were respectively diluted with a fresh preparation of the same buffer to give a concentration of about one mg/ml.

To one ml aliquot of the resultant each solution was added 10µg "LYSYL ENDOPEPTIDASE", a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, and allowed to react at 30°C for 22 hours to form peptides which were then separated on reverse phase high-performance liquid chromatography (reverse phase HPLC). The apparatus and conditions used to separate the peptides of the enzyme preparation from *Rhizobium* sp. M-11 in the reverse phase HPLC were "CAPCELL PAK C18 column", a diameter of 4.6 mm and a length of 250 mm, a product of Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan; a flow rate, 0.6 ml/min; a temperature, an ambient temperature; an elution time, 60 min; and a gradient, a liner gradient of a solution containing 0.1 v/v % trifluoro acetate and acetonitrile ranging from 16-48 v/v %. The apparatus and conditions used to separate the peptides of the enzyme preparation from *Arthrobacter* sp. Q36 in the reverse phase HPLC were "µ-BONDAPAK C18 column" having a diameter of 2.1 mm and a length of 150 mm, a product of Waters Chromatography Div., MILLIPORE Corp., Milford, USA; a flow rate, 0.9 ml/min; a temperature, an ambient temperature; an elution time, 60 min; and a gradient, a liner gradient of a solution containing 0.1 v/v % trifluoro acetate and acetonitrile ranging from 30-55 v/v %. The peptides eluted from the columns were detected by monitoring an absorbency at a wavelength of 210 nm. From the enzyme preparation of *Rhizobium* sp. M-11 three peptides named as RT41, RT46 and RT54 having respective retention times of about 41, 46 and 54 were

separated from other concomitant peptides, and from the enzyme preparation of *Arthrobacter* sp. Q36 three peptides named as AT7, AT30 and AT48 having respective retention times of about 7, 30 and 48 were separated from other concomitant peptides, followed by drying the separated peptides *in vacuo* and dissolving the resultants in 200 µl solutions having different concentrations of 0.1-50 v/v % acetonitrile. Each peptide specimen thus obtained was analyzed on a protein sequencer for its amino acid sequence up to 10 amino acid residues. The analyzed internal partial amino acid sequences were as shown in Table 10.

Table 10

| Origin                         | Peptide | Internal partial amino acid sequence   |
|--------------------------------|---------|--|
| <i>Rhizobium</i> sp.<br>M-11   | RT41    | histidine-glycine-glutamic acid-glycine-asparagine-threonine-tryptophane-glycine-aspartic acid-serine        |
|                                | RT46    | aspartic acid-glutamic acid-arginine-alanine-valine-histidine-isoleucine-leucine-glutamic acid-glutamic acid |
|                                | RT54    | leucine-aspartic acid-tryptophane-alanine-glutamic acid-alanine-serine-alanine-glycine-aspartic acid         |
| <i>Arthrobacter</i><br>sp. Q36 | AT30    | glutamine-glycine-glutamic acid-glycine-asparagine-threonine-tryptophane-glycine-aspartic acid-serine        |
|                                | AT48    | aspartic acid-glutamic acid-arginine-alanine-valine-histidine-isoleucine-leucine-glutamic acid-aspartic acid |
|                                | AT7     | leucine-aspartic acid-tryptophane-alanine-glutamic acid-alanine-alanine-glutamic acid-glycine-aspartic acid  |

As evident from Table 10, 9 of 10 amino acid residues in the internal partial amino acid sequence of peptide RT41 of the enzyme derived from *Rhizobium* sp. M-11 coincided with those of peptide AT30 of the enzyme derived from *Arthrobacter* sp. Q36, while those of peptide RT46 coincided with those of peptide AT48 with respect to their 9 of 10 amino acid residues. In the case of peptides RT54 and AT7, they were identical with respect to their 8 of 10 amino acid residues. Accordingly, it is judged that the enzyme derived from microorganisms of the genus *Rhizobium* and that derived from microorganisms of the genus *Arthrobacter* have a relatively-high homology with respect to their internal partial amino acid sequences which can be expressed by leucine-asparagine-tryptophane-alanine-glutamic acid-alanine-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-glycine-aspartic acid (where "X<sub>1</sub>" means "serine" or "alanine", and "X<sub>2</sub>" means "alanine" or "glutamic acid"); aspartic acid-glutamic acid-arginine-alanine-valine-histidine-isoleucine-leucine-glutamic acid-X<sub>3</sub> (where "X<sub>3</sub>" means "glutamic acid" or "aspartic acid"); and X<sub>4</sub>-glycine-glutamic acid-glycine-asparagine-threonine-tryptophane-glycine-asparagine-serine (where "X<sub>4</sub>" means "histidine" or "glutamine").

The following Examples A illustrate the preparation of the present trehalose-releasing enzyme, trehalose prepared therewith, and saccharide compositions containing the trehalose; and Examples B illustrate compositions containing one or more of these trehalose and saccharide compositions:

#### Example A-1

A seed culture of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130) was inoculated in a nutrient culture medium and incubated by a fermenter for about 80 hours in accordance with the method in Experiment 1. After completion of the incubation, the resultant culture was filtered to remove cells with an SF-membrane to obtain an about 18 L filtrate, followed by concentrating the filtrate with a UF-membrane into an about one L enzyme solution containing 17.2 units/ml of a non-reducing saccharide-forming enzyme and 20.8 units/ml of the present trehalose-releasing enzyme.

To 15% suspension of potato starch, d.s.b., was added calcium carbonate to give a final concentration of 0.1%, d.s.b., and the resultant solution was adjusted to pH 6.0, mixed with 0.2% by weight of "TERMAMYL 60L", an  $\alpha$ -amylase specimen commercialized by Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark, and subjected to an enzymatic reaction at 95°C for 15 min. The reaction mixture was autoclaved at a pressure of 2 kg/cm<sup>2</sup> for 30 min, cooled to 45°C, admixed with 1,000 units/g starch, d.s.b., of "PULLULANASE (EC 3.2.1.41)", an enzyme specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 0.2 ml/g starch, d.s.b., of the above enzyme solution, and subjected to an enzymatic reaction for 48 hours. The reaction mixture thus obtained was kept at 95°C for 10 min, cooled and filtered, and the resultant filtrate was in usual manner decolored with an activated charcoal, desalted and purified with ion-exchangers



in H- and OH-form, followed by concentrating the resultant solution to obtain a 60% syrup in a yield of about 92%, d.s.b.

The syrup, which contains 70.2% trehalose, 2.4% glucosyltrehalose, 3.3% maltosyltrehalose, 0.7% glucose, 10.1% maltose, 12.9% maltotriose and 0.4% of maltotetraose and higher oligosaccharides, d.s.b., has a moderate and high-quality sweetness and a relatively-low reducing power, as well as an appropriate viscosity and moisture-retaining ability. Because of these it can be arbitrarily used in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, diluent, filler and excipient.

#### Example A-2

A saccharide solution as a feed solution, obtained by the method in Example A-1, was fractionated by using a column packed with "XT-1016 (Na<sup>+</sup>-form, polymerization degree of 4%)", an alkaline-metal strong-acid cation exchange resin commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan. The procedure was as follows: The resin was packed in 4-jacketed stainless steel columns having an inner diameter of 5.4 cm, and the columns were cascaded in series to give a total gel-bed depth of 20 m. The columns were heated to give the inner column temperature of 55°C and fed with 5 v/v % of the saccharide solution against the resin while keeping at the temperature, and fed with 55°C hot water to fractionate the saccharide solution and to remove concomitant saccharides such as maltose and maltotriose, followed by recovering

trehalose-rich fractions. The fractions thus obtained were pooled, purified, concentrated, dried *in vacuo* and pulverized to obtain a high trehalose content powder in a yield of about 56%, d.s.b.

The content of trehalose in the product is about 97%, d.s.b., and the product has a mild and high-quality sweetness, and, because of these it is arbitrarily used in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient and filler.

#### Example A-3

A high trehalose content fraction obtained by the method in Example A-2 was in usual manner decolored with an activated charcoal, desalted with an ion-exchanger, and concentrated into an about 70% solution which was then placed in a crystallizer, admixed with about 2% hydrous crystalline trehalose as a seed crystal, and gradually cooled to obtain a massecuite with a crystallinity of about 45%. The massecuite was sprayed from a nozzle equipped at the top of a drying tower at a high pressure of 150 kg/cm<sup>2</sup>. In the spraying step, the massecuite was simultaneously ventilated with 85°C hot air being sent from the top of the drying tower, and the resultant crystalline powder was collected on a metal wire netting conveyer provided on the basement of the drying tower, and gradually moved out of the drying tower while a stream of 45°C air was passing upwards through the metal wire netting. The resultant crystalline powder was injected in an ageing tower

and aged for 10 hours to complete the crystallization and drying, followed by recovering a powdery hydrous crystalline trehalose in a yield of about 90% against the material high trehalose content fraction, d.s.b.

The product is substantially non-hygroscopic and handles easily, and these render it arbitrarily useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient and filler.

#### Example A-4

A high trehalose content fraction obtained by the method in Example A-2 was purified similarly as in Example A-3, and the resultant was placed in an evaporator, and boiled up *in vacuo* to obtain a syrup with a moisture content of about 3.0%. The resultant syrup was placed in a crystallizer, admixed with one % anhydrous crystalline trehalose against the dry weight of the syrup, and crystallized at 120°C for 5 min under stirring conditions, and the resultant mixture was placed in a aluminum plain container and aged at 100°C for 6 hours to obtain a block.

The resultant block was pulverized by a cutter and dried by a fluidized-bed drying to obtain a powdery anhydrous crystalline trehalose with a moisture content of about 0.3% in a yield of about 85% against the material high trehalose content fraction, d.s.b. The product can be arbitrarily used as a desiccant in food products, cosmetics, pharmaceuticals, and their materials and intermediates, and also can be used as

a white powdery sweetener in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

#### Example A-5

In accordance with the method in Example A-1, a seed culture of a mutant of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130) was inoculated in a nutrient culture medium and incubated by a fermenter for about 70 hours. After completion of the incubation, the resultant cells were membrane filtered with an SF-membrane to recover an about 100 L filtrate which was then concentrated with a UF-membrane to obtain an about 5 L enzyme solution containing about 410 units/ml of a non-reducing saccharide-forming enzyme and about 490 units/ml of a trehalose-releasing enzyme.

Six % suspension of potato starch was gelatinized by heating, adjusted to pH 4.5, heated to 50°C, admixed with 500 units/g starch, d.s.b., of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 20 hours. The reaction mixture was adjusted to pH 6.5, autoclaved at 120°C for 10 min, cooled to 95°C, admixed with 0.1% per g starch, d.s.b., of "TERMAMYL 60L", an  $\alpha$ -amylase specimen commercialized by Novo Industri A/S Copenhagen Denmark, and subjected to an enzymatic reaction for 15 min. The reaction mixture was autoclaved at 130°C for 30 min, cooled to 45°C, admixed with 0.01 ml per g starch, d.s.b., of the above-mentioned enzyme solution, and subjected to an enzymatic reaction for 64 hours. The resultant reaction mixture was kept

at 95°C for 10 min, cooled to 50°C, adjusted to pH 5.0, admixed with 10 units/g starch, d.s.b., of "GLUCOZYME", a glucoamylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, subjected to an enzymatic reaction for 40 hours, and heated to inactivate the remaining enzyme. The solution thus obtained was in usual manner decolored with an activated charcoal, desalted with an ion-exchanger and concentrated into an about 60% solution containing 80.5% trehalose, d.s.b. The solution was concentrated into an about 84% solution which was then placed in a crystallizer and admixed with an about 2% hydrous crystalline trehalose as a seed crystal against the dry weight of the solution to crystallize trehalose under stirring conditions. The resultant was placed in a plain plastic-vessel and allowed to stand at an ambient temperature for 3 days to form a block which was then pulverized by a cutter to obtain a powdery hydrous crystalline trehalose in a yield of about 90% against the material starch, d.s.b.

The product is substantially non-hygroscopic and handles easily, and these render it arbitrarily useful in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient and filler.

#### Example A-6

A seed culture of a microorganism of *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316) was inoculated in a nutrient culture medium and cultured with a fermenter for about 72 hours in accordance with the method in Experiment 9. The resultant culture was

centrifuged at 10,000rpm for 30 min to remove cells, and the resultant supernatant was concentrated with a UF-membrane to obtain one L of an enzyme solution containing 16.3 units/ml of a non-reducing saccharide-forming enzyme and 25.1 units/ml of the present trehalose-releasing enzyme.

One part by weight of potato starch was mixed with 6 parts by weight of water and 0.01 part by weight of "NEO-SPITASE", an  $\alpha$ -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals Ltd., Kyoto, Japan, and the resultant mixture was mixed by stirring, adjusted to pH 6.2 and heated to 85-90°C to gelatinize and liquefy the starch. The resultant liquefied starch was autoclaved at 120°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme, cooled to 45°C, admixed with 500 units/g starch of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 0.2 ml/g starch of the above enzyme solution, and subjected to an enzymatic reaction for 48 hours. After completion of the reaction, the reaction mixture was heated at 95°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme, adjusted to 50°C and pH 5.0, admixed with 10 units/g starch "GLUCOZYME", a glucoamylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals Ltd., Kyoto, Japan, subjected to an enzymatic reaction for 40 hours, and heated to inactivate the remaining enzyme. The reaction mixture thus obtained was in usual manner decolorized with an activated charcoal, desalted with an ion-exchanger, and concentrated into an about 60% solution containing 78.3% trehalose, d.s.b. In accordance with the method in Example A-2

except for using as the ion-exchanger "CG 6000 (Na<sup>+</sup>-form)", an alkaline-metal strong-acid cation-exchange resin commercialized by Japan Organo Co, Ltd., Tokyo, Japan, the concentrated solution was subjected to an ion-exchange column chromatography to obtain a high trehalose content fraction containing about 95% trehalose, d.s.b. The fraction was concentrated to give a concentration of 75%, placed in a crystallizer, crystallized by the addition of about 2% hydrous crystalline trehalose as a seed crystal under stirring conditions, transferred to a plain plastic-container, allowed to stand and aged at an ambient temperature for 3 days to obtain a block, followed by pulverizing it with a cutter to obtain a powdery hydrous crystalline trehalose in a yield of about 70% against the material starch, d.s.b.

The product, which is substantially free from hygroscopicity and handles easily, can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, excipient, filler and diluent in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

#### Example A-7

In accordance with the method in Experiment 13, a seed culture of a microorganism of the species *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) was inoculated in a nutrient culture medium, and cultured by a fermenter for about 72 hours, and the resultant culture was treated with a cell disrupting apparatus. The resultant mixture was centrifuged at 10,000rpm for 30 min

to remove residues, and the resultant supernatant was concentrated with a UF-membrane, followed by the recovery of an about 700 ml solution containing about 8 units/ml of a non-saccharide-forming enzyme and about 12 units/ml of a trehalose-releasing enzyme.

A 33% tapioca starch suspension was admixed with calcium carbonate to give a final concentration of 0.1%, adjusted to pH 6.0, admixed with 0.3% "TERMAMYL 60L", an  $\alpha$ -amylase specimen commercialized by Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark, and subjected to an enzymatic reaction at 95°C for 20 min. The resultant reaction mixture was autoclaved under a pressure of 2 kg/cm<sub>2</sub> for 30 min, cooled to 40°C, admixed with 200 units/g starch of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 0.2 ml/g starch of the above enzyme solution, and subjected to an enzymatic reaction for 48 hours. The reaction mixture thus obtained was kept at 95°C for 10 min, cooled and filtered to obtain a filtrate which was then in usual manner decolored with an activated charcoal, desalted with ion-exchangers in H- and OH-form, and concentrated to obtain a 60% syrup in a yield of about 90%, d.s.b.

The product, which contains 60.1% trehalose, 1.4% glucosyltrehalose, 1.5% maltosyltrehalose, 1.0% glucose, 6.5% maltose, 8.3% maltotriose, 21.2% maltotetraose and higher maltooligosaccharides, has a mild and high-quality sweetness as well as a relatively-low reducing power and an adequate moisture-retaining ability. Because of these, it can be used



in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient, filler and diluent.

#### Example A-8

A high trehalose content solution containing about 95% trehalose, obtained by the method in Example A-6, was in usual manner decolored and desalted. The resultant solution was concentrated into an about 75% solution which was then transferred to a crystallizer, admixed with about 2% hydrous crystalline trehalose as a seed crystal, heated to 50°C, gradually cooled to 25°C while stirring, and subjected to a separation using a basket-type centrifuge. The resultant crystal was washed by spraying it with a small amount of water to obtain a high-purity hydrous crystalline trehalose with a purity of 99% or higher in a yield of about 50%.

#### Example B-1

##### Sweetener

To one part by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose, obtained by the method in Example A-5, was homogeneously added 0.01 part by weight of "αG SWEET", an α-glycosyl stevioside product commercialized by Toyo Sugar Refining Co., Ltd., Tokyo, Japan, and 0.01 part by weight of "ASPARTAME", a product of L-aspartyl-L-phenylalanine methylester commercialized by Ajinomoto Co., Ltd., Tokyo, Japan, and the resultant mixture was fed to a granulator to obtain a granular sweetener. The product has a satisfactory

sweetness and an about 2.5-fold higher sweetening power of sucrose, and the caloric value is lowered to about 2/5 of that of sucrose.

Since the product has a satisfactory stability and does not decompose other sweeteners to be mixed, it can be suitably used as a low-caloric sweetener for low-caloric food products for fat persons and diabetics who are restricted to a reduced calorie intake.

The product substantially does not form acids and insoluble glucans when dental carries-inducing microorganisms act on it, and this renders it useful for sweetening food products to prevent dental carries.

#### Example B-2

##### Hard candy

One hundred parts by weight of 55% sucrose solution was mixed while heating with 30 parts by weight of a trehalose syrup, obtained by the method in Example A-7, and the resultant solution was concentrated *in vacuo* until the moisture content lowered to below 2%. The concentrated solution was admixed with one part by weight of citric acid and adequate amounts of a lemon flavor and a coloring agent, and the resultant mixture was in usual manner formed into the desired product.

The product is a high-quality hard candy having a satisfactory taste and biting property, as well as having no fear of causing crystallization of sucrose.

#### Example B-3

##### Chewing gum

Three parts by weight of a gum base was melted by heating until it softened, and the resultant was mixed with 4 parts by weight of sucrose and 3 parts by weight of a hydrous crystalline trehalose powder obtained by the method in Example A-3, and further mixed with adequate amounts of a flavor and a coloring agent. The resultant mixture was in usual manner kneaded by a roll, formed and packed to obtain the desired product.

The product is a chewing gum having a satisfactory texture and taste.

#### Example B-4

##### Sweetened condensed milk

Three parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-1 and one part by weight of sucrose were dissolved in 100 parts by weight of fresh milk, and the resultant solution was sterilized by heating with a plate heater, and condensed to give a concentration of 70%, followed by aseptically canning the resultant concentrate into the desired product.

The product has a mild sweetness and a satisfactory taste, and these render it arbitrarily useful as a seasoning for baby foods, foods for infants, fruit, coffee, cocoa and tea.

#### Example B-5

##### Lactic acid beverage

One hundred and seventy-five parts by weight of defatted milk, 130 parts by weight of a trehalose syrup

obtained by the method in Example A-1, and 50 parts by weight of a high lactosucrose content powder as disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.281,795/92 were dissolved in 1,150 parts by weight of water. The resultant solution was sterilized at 65°C for 30 min, cooled to 40°C and inoculated with 30 parts by weight of lactic acid bacterium as a starter, followed by the incubation at 37°C for 8 hours to obtain the desired product.

The product is a lactic acid beverage with a satisfactory taste and flavor. Since the product contains oligosaccharides, it stably retains lactic acid bacteria and promotes the growth of bifid bacteria.

#### Example B-6

##### Powdered juice

Thirty-three parts by weight of a powdered orange juice prepared by spray drying was mixed to homogeneity with 50 parts by weight of a high trehalose content powder obtained by the method in Example A-2, 10 parts by weight of sucrose, 0.65 parts by weight of anhydrous citric acid, 0.1 part by weight of malic acid, 0.1 part by weight of L-ascorbic acid, 0.1 part by weight of sodium citrate, 0.5 parts by weight of pullulan, and an adequate amount of a powdered flavor. The resultant mixture was pulverized and fed to a fluidized-bed granulator to obtain granules while being sprayed with as a binder a trehalose syrup, obtained by the method in Example A-1, and ventilated with 40°C air. The granules thus obtained were weighed and packed to obtain the desired product.

The product containing 30% orange juice, d.s.b., retained its high quality for a relatively-long period of time without giving an unsatisfactory taste and smell.

#### Example B-7

##### Custard cream

One hundred parts by weight of corn starch, 100 parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-7, 80 parts by weight of maltose, 20 parts by weight of sucrose, and one part by weight of salt were mixed to homogeneity. The resultant mixture was admixed with 280 parts by weight of egg, and gradually added with 1,000 parts by weight of a boiling milk. The mixture thus obtained was continued stirring under heating conditions, and the heating was stopped when the corn starch in the mixture was completely gelatinized to give the whole contents semitransparent, followed by cooling the mixture and adding thereto an adequate amount of a vanilla flavor. The resultant mixture was weighed, injected and packed to obtain the desired product.

The product has a smooth surface and gloss, as well as a mild taste and sweetness.

#### Example 8

##### Uiro-no-moto (premix of starch paste)

Ninety parts by weight of rice powder, 20 parts by weight of corn starch, 40 parts by weight of sucrose, 80 parts by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-3, and 4 parts by weight of pullulan

were mixed to homogeneity to obtain a *uiro-no-moto*. The product was kneaded with adequate amounts of *matcha* (green tea) and water, and the mixture was placed in a container and steamed up for 60 min to obtain a *matcha-uiro*.

The product has a satisfactory gloss and biting property, as well as a satisfactory flavor and taste, and has a relatively-long shelf-life because the retrogradation of starch is well inhibited.

#### Example B-9

##### An (beans paste)

Ten parts by weight of *adzuki* beans as a material was in usual manner mixed with water and boiled, followed by removing the astringency, harshness of the beans, and water-soluble impurities to obtain about 21 parts by weight of "*adzuki-tsubu-an*". To the resultant were added 14 parts by weight of sucrose, 5 parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-1, and 4 parts by weight of water, and the resultant mixture was boiled, mixed with a small amount of salad oil, and carefully kneaded up so as not to paste the beans. Thus, the desired product was obtained in a yield of about 35 kg.

The product free from discoloration induced by boiling has a satisfactory taste and flavor, and these render it useful as a material an for bean-jam buns, buns with bean-jam filling, dumplings, bean-jam-filled wafers, sherbets and ice creams.

#### Example B-10

##### Bread

One hundred parts by weight of wheat powder, 2 parts by weight of yeast, 5 parts by weight of sugar, one part by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-3, 0.1 part by weight of inorganic yeast food were kneaded with water in usual manner, fermented at 26°C for 2 hours, aged for 30 min and baked up.

The product is a high-quality bread having a satisfactory hue and rising, as well as a satisfactory elasticity and mild sweetness.

#### Example B-11

##### Ham

To one thousand parts by weight of sliced ham meat were added and ground to homogeneity 15 parts by weight of salt and 3 parts by weight of potassium nitrate, and the ham meat slices were piled up and allowed to stand overnight in a cold-storage room. Thereafter, the resultant slices were first soaked in a salt solution consisting of 500 parts by weight of water, 100 parts by weight of salt, 3 parts by weight potassium nitrate, 40 parts by weight of a powder containing non-reducing saccharides prepared by the method in Example A-6, and an adequate amount of a peppermint for 7 days in a cold-storage room, then washed with cold water in usual manner, tied up, smoked, cooked, cooled and packed to obtain the desired product.

The product is a high-quality ham having a

satisfactory hue, taste and flavor.

#### Example B-12

##### Powdery peptide

One part by weight of "HINUTE S", a peptide solution containing 40% edible soy beans commercialized by Fuji Oil Co., Ltd., Tokyo, Japan, was mixed with 2 parts by weight of a powder containing a powdery hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-6, and the resultant mixture was placed in a plastic vessel, dried *in vacuo* at 50°C, and pulverized to obtain a powdery peptide.

The product having a satisfactory taste and flavor can be arbitrarily used as a material for confectioneries such as premixes, sherbets and ice creams, as well as baby foods and nutritions for therapy in the form of an oral or an intubation feeding.

#### Example B-13

##### Powdered miso

To one part by weight of *akamiso* (a kind of *miso*) was added 3 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-4, and the mixture was poured into a metal plate having hemisphere wells on its surface and allowed to stand at an ambient temperature overnight to obtain *miso* solids, about 4 g weight each, which were then subjected to a pulverizer to obtain the desired product.

The product can be arbitrarily used as a seasoning



for instant noodles and soups, as well as a *miso* confectionery.

#### Example B-14

##### Powdery egg yolk

Egg yolks prepared from fresh eggs were sterilized at 60-64°C by a plate heater, and one part by weight of the resultant liquid was mixed with 4 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-4 with respect to one part by weight of the liquid. The resultant mixture was transferred to a vessel, allowed to stand overnight to form a block while the anhydrous crystalline trehalose was allowing to convert into hydrous crystalline trehalose. The block thus obtained was pulverized by a cutter to obtain a powdery egg yolk.

The product can be arbitrarily used as a material for confectioneries for premixes, sherbets, ice creams and emulsifiers, as well as baby foods and nutritions for therapy in the form of an oral or an intubation feeding. The product can be also used as a skin refiner and hair restorer.

#### Example B-15

##### Cosmetic cream

Two parts by weight of polyoxyethylene glycol monostearate, 5 parts by weight of glyceryl monostearate, self-emulsifying, 2 parts by weight of a high trehalose content powder obtained by the method in Example A-2, one part by weight of  $\alpha$ -glycosyl rutin, one part by weight of liquid petrolatum, 10 parts by weight of glyceryl tri-2-ethylhexanoate, and an adequate amount of an antiseptic were

in usual manner dissolved by heating. The resultant solution was admixed with 2 parts by weight of L-lactic acid, 5 parts by weight of 1,3-butylene glycol and 66 parts by weight of refined water, and the resultant mixture was emulsified by a homogenizer and admixed with an adequate amount of a flavor under stirring conditions to obtain a cosmetic cream.

The product having a relatively-high stability can be arbitrarily useful as a high-quality sunscreen, skin-refining agent and skin-whitening agent.

#### Example B-16

##### Powdery ginseng extract

A half part by weight of ginseng extract was mixed with 1.5 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-4, and the resultant mixture was transferred to a plain container, allowed to stand for 2 days to convert anhydrous crystalline trehalose into hydrous crystalline trehalose to form a block. The resultant block was pulverized by a cutter and classified to obtain a powdery ginseng extract.

The product and adequate amounts of powdery vitamins B1 and B2 were subjected to a granulator to obtain a powdery ginseng extract containing vitamins.

The product thus obtained can be arbitrarily used as a tonic, fatigue-relieving agent and vitality-imparting agent. The product can be also used as a hair restorer.

#### Example B-17

##### Solid pharmaceutical

A natural human interferon- $\alpha$  preparation, commercialized by Cosmo Bio, Tokyo, Japan, was in usual manner fed to a column of an immobilized anti-human interferon- $\alpha$  antibody to adsorb the interferon- $\alpha$ , and a buffer containing calf serum albumin as a stabilizer was fed to the column, followed by removing an excessive amount of the albumin. Thereafter, the interferon- $\alpha$  was eluted from the column with a physiological saline containing 5% of a high trehalose content powder, prepared by the method in Example A-2, while the pH of the physiological saline was varying. The resultant eluate was membrane filtered, and the filtrate was dehydrated by the addition of about 20-fold volumes of "FINETOSE<sup>®</sup>", an anhydrous crystalline maltose powder commercialized by Hayashibara Shoji, Inc., Okayama, Japan, followed by pulverizing the resultant dehydrated product, and tableting the resultant powder by a tableting machine to obtain tablets containing about 150 units of the natural human interferon- $\alpha$  per one tablet, about 200 mg weight.

The product can be orally administered as a sublingual tablet to patients at a dose of 1-10 tablets/adult/day, and arbitrarily used to treat viral diseases, allergys, rheumatisms, diabetes and malignant tumors. More particularly, the product can be suitably used as a therapeutic agent for AIDS and hepatitis, the number of patients suffering from these diseases has been remarkably increased. The trehalose and maltose incorporated in the product act as a stabilizer for the natural human interferon- $\alpha$ ,

so that the activity is well retained for a relatively-long period of time even at an ambient temperature.

#### Example B-18

##### Sugar coated tablet

A crude tablet as a core, 150 mg weight, was coated with a solution consisting of 40 parts by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-3, 2 parts by weight of pullulan having an average molecular weight of 200,000, 30 parts by weight of water, 25 parts by weight of talc, and 3 parts by weight of titanium oxide until the total weight reached to about 230 mg, and the resultant was further coated with a solution consisting of 65 parts by weight of a fresh preparation of the same powdery hydrous crystalline trehalose, one part by weight of pullulan, and 34 parts by weight of water, and glossed with a liquid wax to obtain a sugar coated tablet having a satisfactory gloss and appearance.

The product has a relatively-high shock tolerance and retains its high quality for a relatively-long period of time.

#### Example B-19

##### Dentifrice

A dentifrice was prepared in usual manner by mixing the following ingredients:

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Calcium monohydrogenphosphate    | 45.0% |
| Pullulan                         | 2.95% |
| Sodium lauryl sulfate            | 1.5%  |
| Glycerine                        | 20.0% |
| Polyoxyethylene sorbitan laurate | 0.5%  |

|   |       |
|---|-------|
| Antiseptic  | 0.05% |
| Powdery hydrous crystalline<br>trehalose prepared by the<br>method in Example A-3 | 12.0% |
| Maltitol  | 5.0%  |
| Water   | 13.0% |

The product is satisfactorily used as a dentifrice for infants because it has an adequate sweetness.

#### Example B-20

##### Solid preparation for intubation feeding

A composition consisting of the following compositions was prepared: Five hundred parts by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-6, 270 parts by weight of powdered egg yolk, 209 parts by weight of defatted milk, 4.4 parts by weight of sodium chloride, 1.8 parts by weight of potassium chloride, 4 parts by weight of magnesium sulfate, 0.01 part by weight of thiamine, 0.1 part by weight of sodium ascorbate, 0.6 parts by weight of vitamin E acetate, and 0.04 parts by weight of nicotinamide. Twenty-five g aliquots of the composition were injected into moisture-proof laminated small bags and heat sealed to obtain the desired product.

One bag of the product is dissolved in about 150-300 ml of water into a fluid food, and orally or parenterally administered to nasal cavity, stomach or intestine by intubation feeding to supplement energy to living bodies.

#### Example B-21

##### Hyperalimentation

A high-purity hydrous crystalline trehalose, prepared by the method in Example A-8, was dissolved in water into an about 10 w/v % aqueous trehalose solution which was then in usual manner membrane filtered to remove pyrogen, aseptically injected into a plastic bottle, and sealed to obtain the desired product.

The product, which is a satisfactorily stable hyperalimentation substantially free of change on standing, is suitable for intravenous- and intraperitoneal-administrations. A 10 w/v % solution of the product is isotonic to blood, and this means it can supplement energy to living bodies at 2-fold higher concentration than in the case of glucose.

#### Example B-22

##### Hyperalimentation

A high-purity hydrous crystalline trehalose, prepared by the method in Example A-8, and an amino acid composition consisting of the following components were dissolved by stirring in water to give respective concentrations of 5 w/v % and 30 w/v %, and, similarly as in Example B-10 the resultant solution was purified to obtain a pyrogen-free solution, followed by injecting it into a plastic bottle and sealed to obtain the desired product.

Components of amino acid composition

| Component                     | mg/100 ml |
|-------------------------------|-----------|
| L-Isoleucine                  | 180       |
| L-Leucine                     | 410       |
| L-Lysine monohydrochloride    | 620       |
| L-Methionine                  | 240       |
| L-Phenyl alanine              | 290       |
| L-Threonine                   | 180       |
| L-Tryptophane                 | 60        |
| L-Valine                      | 200       |
| L-Arginine hydrochloride      | 270       |
| L-Histidine monohydrochloride | 130       |
| Glycine                       | 340       |

Although the product is a multiple hyperalimentation containing trehalose and amino acids, it is satisfactorily stable without substantial change on standing and can be suitably administered intravenously and intraperitoneally to living bodies. The product can be arbitrarily used to supplement energy as well as amino acids to living bodies.

Example B-23

Ointment for treating trauma

Two hundred parts by weight of a high trehalose content powder, prepared by the method in Example A-2, and 300 parts by weight of maltose were admixed with 50 parts by weight of methanol solution containing 3 parts by weight of iodine,

and the resultant solution was mixed with 200 parts by weight of a 10 w/v % aqueous pullulan solution to obtain the desired product having a satisfactory extensibility and adhesiveness.

The iodine contained in the product exerts a bactericidal activity, and the trehalose in the product acts as an energy-supplementing agent on viable cells, and because of these the product shortens a healing period and satisfactorily heals a wound surface.

[Effect of the invention]

As is evident from above, the present novel trehalose-releasing enzyme releases trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and forms trehalose in a relatively-high yield when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates together with a non-reducing saccharide-forming enzyme. The trehalose thus obtained can be readily separated and purified, and the resultant purified trehalose and saccharide compositions containing it has a satisfactory stability as well as a relatively-high quality and mild sweetness. It is readily assimilated, absorbed and utilized by living bodies when orally administered intact or parenterally administered in the form of a transfusion agent. Trehalose per se and saccharide compositions containing the same can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient and filler in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.



Thus, the present invention provides a novel technique to prepare trehalose and saccharide compositions containing the same in an industrial-scale and a relatively-low cost from partial starch hydrolysates prepared from starch, a cheap and abundant natural source. Therefore, the present invention gives an unfathomable great influence on the fields such as starch-, enzyme- and biochemical-sciences, and other industrial fields, especially, food-, cosmetic- and pharmaceutical-industries, as well as forestry, fisheries, and agricultural-, livestock- and chemical-industries. Thus, the influence of the present invention on the fields is unfathomably great.

#### Brief Explanation of the Accompanying Drawings

FIG.1 shows elution patterns of the present trehalose-releasing enzyme and a non-reducing saccharide-forming enzyme eluted from a column packed with a gel of "DEAE-Toyopearl®".

FIG.2 shows the influence of temperature on the activity of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.3 shows the influence of pH on the activity of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.4 shows the influence of temperature on the stability of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.5 shows the influence of pH on the stability of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.6 shows the influence of temperature on the activity of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.7 shows the influence of pH on the activity of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.8 shows the influence of temperature on the stability of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.9 shows the influence of pH on the stability of the present trehalose-releasing enzyme derived from a microorganism of the species *Arthrobacter* sp. Q36.

[Document name]        Abstract

[Summary]

[Object]            The object of the present invention is to establish a trehalose-releasing enzyme to form trehalose from reducing partial starch hydrolysates, and its preparation and uses.

[Construction]      The present invention is mainly constructed by (i) a novel trehalose-releasing enzyme and its preparation, (ii) microorganisms capable of forming the enzyme, (iii) trehalose obtained by allowing the enzyme together with a non-reducing saccharide-forming enzyme to act on reducing partial starch hydrolysates, (iv) saccharide compositions containing the trehalose, and (v) other compositions containing the trehalose.

[Selected figure]    None

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 7 - 2 1 3 2 8 3

(43) 公開日 平成 7 年 (1995) 8 月 15 日

(51) Int. Cl. <sup>9</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12N 9/24

1/20

A 8828-4B

C12P 19/14

Z 7432-4B

// (C12N 9/24

C12R 1:41 )

審査請求 未請求 請求項の数 18 F D (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 6 - 7 9 2 9 1

(22) 出願日 平成 6 年 (1994) 3 月 28 日

(31) 優先権主張番号 特願平 5 - 1 5 6 3 3 8

(32) 優先日 平 5 (1993) 6 月 3 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平 5 - 3 4 0 3 4 3

(32) 優先日 平 5 (1993) 1 2 月 9 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 0 0 0 1 5 5 9 0 8

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者 丸田 和彦

岡山県岡山市桑野 5 2 5 番 3 - 2 1 4 号

(72) 発明者 久保田 倫夫

大阪府茨木市主原町 1 2 番 6 号

(72) 発明者 杉本 利行

岡山県岡山市東畦 6 9 5 番 4 4 号

(72) 発明者 三宅 俊雄

岡山県岡山市伊島町 1 丁目 3 番 2 3 号

(54) 【発明の名称】 トレハロース遊離酵素とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】 還元性澱粉部分分解物からトレハロースを製造するためのトレハロース遊離酵素とその製造方法並びにその用途の確立を目的とする。

【構成】 本発明は、新規トレハロース遊離酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、還元性澱粉部分分解物から、このトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素とを用いて、トレハロースおよびそれを含む糖質、並びにトレハロースを含有せしめた組成物を構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素。

【請求項2】 グリコシル部分が、重合度1以上のグルコース残基から構成されている請求項1記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項3】 トレハロース遊離酵素が、微生物由来の酵素であることを特徴とする請求項1または請求項2記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項4】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属およびマイクロコッカス属から選ばれる微生物である請求項3記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項5】 下記の理化学的性質を有するトレハロース遊離酵素。

## (1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

## (2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

## (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

## (4) 至適温度

pH7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

## (5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

## (6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

## (7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。

【請求項6】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する作用を有し、部分アミノ酸配列として、

(1) ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-アラニン-グルタミン酸-アラニン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-グリシン-アスパラギン酸(但し、X<sub>1</sub>はセリンまたはアラニンを意味し、X<sub>2</sub>はアラニンまたはグルタミン酸を意味する。)

(2) アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロイシン-グルタミン酸-X<sub>3</sub>(但し、X<sub>3</sub>はグルタミン酸またはアスパラギン酸を意味する。)

(3) X<sub>4</sub>-グリシン-グルタミン酸-グリシン-ア

スパラギン-トレオニン-トリプトファン-グリシン-アスパラギン酸-セリン(但し、X<sub>4</sub>はヒスチジンまたはグルタミンを意味する。)

から選ばれる1種または2種以上の部分アミノ酸配列を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項7】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素産生能を有する微生物を栄養培地に培養して、得られる培養物から該トレハロース遊離酵素を採取することを特徴とする末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項8】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属およびマイクロコッカス属から選ばれる微生物である請求項7記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項9】 リゾビウム・スピーシーズ(Rhizobium sp.) M-11(工業技術院微生物工業技術研究所、受託番号 FERM BP-4130)、または、アルスロバクター・スピーシーズ(Arthrobactersp.) Q36(工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号 FERMBP-4316)からなる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素産生能を有する微生物。

【請求項10】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を含有する溶液に、該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素を作用させて得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項11】 グルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させることを特徴とする還元性澱粉部分分解物の還元力を増加させることなくグルコース重合度を低減させる方法。

【請求項12】 グルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性

糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項13】 澱粉を部分的に加水分解して得られるグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項14】 グルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、トレハロースおよびそれ以外の夾雑糖質含有溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロース。

【請求項15】 トレハロースが含水結晶、または無水結晶である請求項12、請求項13または請求項14記載のトレハロース。

【請求項16】 グルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、次いでグルコアミラーゼを作用させ、トレハロースおよびそれ以外の夾雑糖類を含有する溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロース。

【請求項17】 グルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質を含有せしめた組成物。

【請求項18】 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求項17記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トレハロース遊離酵素とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、この新規トレハロース遊離酵素を用いて製造されるトレハロース、および、このトレハロースを含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース) が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー (Advances in Carbohydrate Chemistry)』、第18巻、第201乃至225頁(1963年) アカデミック・プレス社 (米国) および『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology)』、第56巻、第3213乃至3215頁(1990年) などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースは、非還元性糖質ゆえにアミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、アミノ酸含有物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】 トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭50-154485公報で報告されている微生物を用いる方法や、特開昭58-216695公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合わせでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物を用いる方法は、菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当たり15w/w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を%と略称する。) 未満と低く、その上、これを抽出・精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼおよびトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っ

ていない。

【0004】これに關係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開發の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖轉移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であるといわ

れてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造させる澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エキイバレント(Dextrose Equivalent, DE)として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、DEの大小に依存しており、澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】しかしながら、本発明者等は、当業界のこの常識を覆し、特願平4-362131号明細書で開示したように、澱粉を原料として製造されるグルコース重合度が3以上の還元性澱粉部分分解物に、これからその末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼとを作用させることにより、還元性澱粉部分分解物からトレハロースを酵素的に直接生産することに成功している。この非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼによるトレハロース製造方法では、還元性澱粉部分分解物からのトレハロース生成率は約30%であり、工業的に十分に可能であるが、反応変換率の面からトレハロース製造におけるコスト高が懸念される。そこで、還元性澱粉部分分解物からの生成率を更に向上させるトレハロースの新規製造方法の確立が望まれる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安価で安定供給可能な澱粉から生成率の高いトレハロースの新規製造方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するために、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する全く新しい酵素の実現に期待を込めて、この酵素を産生する微生物を広く検索してきた。その結果、先に、特願平4-362131号明細書で開示した土壌からの分離菌リゾビウム(Rhizobium)属に属する非還元性糖質生成酵素産生微生物M-11、および特願平5-265416号明細書で開示した土壌からの分離菌アルスロバクター(Arthrobacter)属に属する非還元性糖質生成酵素産生微生物Q36が、新規トレハロース遊離酵素をも併せて産生することを見だし、還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素とこの新規トレハロース遊離酵素とを作用させることにより、目指していた生成率の高いトレハロース生成反応を容易に行いうることを見だし、また、還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素と新規トレハロース遊離酵素とを作用させ、次いでグルコアミラーゼを作用させることにより、更に高純度トレハロース含有反応液を得ることができ、容易にトレハロースを製造しうることを見だし、本発明を完成した。更に、このトレハロース遊離酵素を産生する微生物を、公知菌より広く検索した。その結果、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属に属する微生物も本発明のトレハロース遊離酵素を産生することが判明し、前記のリゾビウム属、アルスロバクター属に属する微生物由来のトレハロース遊離酵素と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離することを見だし、本発明を完成した。併せて、このようにして得られるトレハロースまたはこれを含む糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立し本発明を完成した。

【0010】次に本発明のリゾビウム属に属する微生物M-11の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準じて行った。

【0011】

【A 細胞形態】肉汁寒天培養、27℃

通常0.6乃至0.8×1.0乃至1.5μmの桿菌。単独、希に直鎖状の二対をなし、連鎖した細胞も観察される。多形性なし。運動性あり。無孢子。鞭毛は周鞭毛。非抗酸性。グラム陰性。カプセル陰性。異染顆粒陽性。Poly-β-hydroxybutyrateを蓄積。

【0012】

【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは24時間で1.5mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 偏平状ないし半レンズ状

光沢 : あり  
 表面 : 平滑  
 色調 : 半透明、クリーム色、ピンク色色素生成なし  
 (2) デキストロース・トリプトン寒天平板培養、27℃  
 コロニーは半透明、クリーム色、mucoïd生成  
 (3) 酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 形状 : F形 大きさは5日で約3mm。  
 色調 : 半透明、クリーム色、mucoïd生成 10  
 (4) コンゴレッド含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 コロニーは仄かなピンク色で、ほとんどコンゴレッドを吸収しない。  
 (5) 2w/v%NaCl含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 生育する。  
 (6) 肉汁寒天斜面培養、27℃  
 生育度 : 良好  
 形状 : 糸状  
 (7) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

## (16) 炭素源の利用と酸生成の有無

|          | 利用性  | 酸生成 |
|----------|------|-----|
| D-グルコース  | 利用する | 陽性  |
| D-ガラクトース | 利用する | 陽性  |
| D-フラクトース | 利用する | 陽性  |
| L-アラビノース | 利用する | 陽性  |
| D-キシロース  | 利用する | 陽性  |
| L-ラムノース  | 利用する | 陽性  |
| マルトース    | 利用する | 陰性  |
| スクロース    | 利用する | 陽性  |
| ラクトース    | 利用する | 陰性  |
| トレハロース   | 利用する | 陰性  |
| ラフィノース   | 利用する | 陽性  |
| マンニトール   | 利用する | 陰性  |
| デキストリン   | 利用する | 陰性  |
| ズルシトール   | 利用する | 陰性  |

(17) アミノ酸の脱炭酸試験 : L-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、いずれに対しても陰性。

(18) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-ヒスチジン、L-プロリンいずれも利用する。

(19) DNase : 陰性

(20) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

(21) DNAのG-C含量 : 61%

【0014】以上の菌学的性質をもとにして、『バージェズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、

液化しない。

## 【0013】

## 【C 生理学的性質】

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| (1) 硝酸塩の還元性     | : 陽性      |
| (2) 脱窒反応        | : 陰性      |
| (3) メチルレッド試験    | : 陰性      |
| (4) VP試験        | : 陰性      |
| (5) インドールの生成    | : 陰性      |
| (6) 硫化水素の生成     | : 陽性      |
| (7) 澱粉の加水分解     | : 陰性      |
| (8) クエン酸の利用     | : 陽性      |
| (9) 無機窒素源の利用    | : アンモニウム塩 |
| および硝酸塩ともに利用できる。 |           |
| (10) 色素の生成      | : なし      |
| (11) ウレアーゼ      | : 陽性      |
| (12) オキシダーゼ     | : 陰性      |
| (13) カタラーゼ      | : 陽性      |
| (14) 生育の範囲      | : pH 5.5  |

乃至9.0

20 温度 4乃至35℃

(15) 酸素に対する態度 : 好気性

第1巻(1984年)を参考にして、公知の菌株との異同を検討した。その結果、リゾビウム属に属する微生物であることが判明した。本菌は、リゾビウム・メリロット(Rhizobium meliloti)に近い性質を示すものの、この菌とは違って、マルトース、ラクトース、マンニトールから酸を生成しない点に違いが認められ、また、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素および該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0015】本発明者等は、これらの結果に基づき、本



菌をリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11と命名した。なお、本菌は、平成4年12月24日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号、微工研条寄第4130号 (FERM BP-4130) で受託された。

【0016】本発明では、上記菌のみならず、リゾビウム属に属し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離するトレハロース遊離酵素を産生する他の菌株、更には、それらの菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0017】次に本発明のアルスロバクター属に属する微生物Q36の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、1985）に準じて行った。

#### 【0018】

##### 【A 細胞形態】

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至0.7×0.8乃至1.6μmの桿菌。単独。多形性あり。運動性なし。無孢子。鞭毛なし。非抗酸性。グラム陽性。カプセル陰性。

(2) EYG寒天培養、27℃

桿菌-球菌の生育サイクルを示す。

#### 【0019】

##### 【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは3日間で2乃至2.5mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 半レンズ状

光沢 : 湿光

表面 : 平滑

色調 : 半透明、白色乃至淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

(3) 酵母エキス・ペプトン寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

10 (4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃  
液化する。

#### 【0020】

##### 【C 生理学的性質】

(1) 硝酸塩の還元性 : 陽性

(2) 脱窒反応 : 陰性

(3) メチルレッド試験 : 陰性

(4) VP試験 : 陽性

(5) インドールの生成 : 陰性

(6) 硫化水素の生成 : 陽性

20 (7) 澱粉の加水分解 : 陰性

(8) セルロースの分解 : 陰性

(9) クエン酸の利用 : 陽性

(10) 無機窒素源の利用 : アンモニウム  
塩および硝酸塩ともに利用できる。

(11) 色素の生成 : なし

(12) ウレアーゼ : 陽性

(13) オキシダーゼ : 陰性

(14) カタラーゼ : 陽性

(15) 生育の範囲 : pH 5乃至

10 温度 4乃至37℃

(16) 酸素に対する態度 : 好気性

#### (17) 炭素源の利用性と酸生成の有無

|          | 利用性  | 酸生成 |
|----------|------|-----|
| D-グルコース  | 利用する | 陰性  |
| D-ガラクトース | 利用する | 陰性  |
| D-フラクトース | 利用する | 陰性  |
| L-アラビノース | 利用する | 陰性  |
| D-キシロース  | 利用する | 陰性  |
| L-ラムノース  | 利用する | 陰性  |
| マルトース    | 利用する | 陰性  |
| スクロース    | 利用する | 陰性  |
| ラクトース    | 利用する | 陰性  |
| ラフィノース   | 利用する | 陰性  |
| マンニトール   | 利用する | 陰性  |
| デキストリン   | 利用する | 陰性  |
| ズルシトール   | 利用する | 陰性  |

(18) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-ヒスチジン、L-プロリンいずれも利用する。

(19) DNase : 陽性

(20) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

50 (21) 細胞壁の主要ジアミノ酸 : リジン

(22) DNAのG-C含量 : 63%  
 【0021】以上の菌学的性質をもとにして、『バーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1984年)を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物であることが半明した。また、本菌は、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元糖糖質生成酵素および該非還元糖糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0022】本発明者等は、これらの結果に基づき、本菌を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ (Arthrobacter sp.) Q36と命名した。なお、本菌は、平成5年6月3日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号 FERM BP-4316で受託された。

【0023】本発明では上記菌株のみならず、アルスロバクター属に属し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離するトレハロース遊離酵素を産生する他の菌株、更には、それらの菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0024】本発明に用いられる微生物としては、本発明のトレハロース遊離酵素産生能を有するものであればよく、例えば、前記の新規微生物リゾビウム・スピーシーズM-11 FERM BP-4130およびアルスロバクター・スピーシーズQ36 FERM BP-4316だけでなく、公知微生物であるブレヴィバクテリウム・ヘロボウム (Brevibacterium helvolum) ATCC11822、ミクロコッカス・ロゼウス (Micrococcus roseus) ATCC186なども有利に利用できる。

【0025】本発明の微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、本発明のトレハロース遊離酵素を産生しうる栄養培地であればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化する物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、還元性澱粉部分分解物などの糖質、または、クエン酸、コハク酸などの有機酸またはそれらの塩なども使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、還元性澱粉部分分解物の場合には、通常、20%以

下が望ましく、菌の生育および増殖からは5%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物、および、例えば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0026】培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好氣的に行われる。培養時間は本微生物が増殖しうる時間であればよく、好ましくは10時間乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常、0.5乃至20ppmが好ましい。そのため、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、また、ファーマンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

【0027】このようにして、微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。本酵素活性は、培養物の菌体および除菌液いずれにも認められ、菌体および除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸塩析法、アセトンおよびアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【0028】更に、除菌液およびその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素液として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破砕法、ガラスビーズおよびアルミナによる機械的破砕法、フレンチプレスによる破砕法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離または膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0029】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、DEAE-トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、トヨパール HW-55 樹脂を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

【0030】このようにして得られる本発明のトレハロース遊離酵素は、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

(5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。

【0031】本発明のトレハロース遊離酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトリオシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシル  $\alpha$ -グルコシド）1.25w/v%（50mMリン酸緩衝液、pH7.0）4mlに酵素液を1ml加え40℃で30分間反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を1単位と定義する。

【0032】本酵素の基質としては、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質であればよく、例えば、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどに非還元性糖質生成酵素を作用させ得られるグルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース、マルトペンタオシルトレハロースなどのグリコシルトレハロースが用いられる。ま

た、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉質をアミラーゼまたは酸などによって部分的に加水分解し得られる還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素を作用させ得られる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を含む低還元性の澱粉部分分解物が用いられる。

【0033】澱粉を部分的に加水分解するアミラーゼとしては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ（Handbook of Amylases and Related Enzymes）』（1988年）パーガモン・プレス社（東京）に記載されている、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼなどが用いられる。これらアミラーゼとプルラーゼおよびイソアミラーゼなどの枝切酵素を併用することも有利に実施できる。

【0034】基質濃度は特に限定されない。例えば、0.1%の基質溶液として用いた場合でも、50%の基質溶液として用いた場合でも、本酵素の反応は進行し、トレハロースを生成する。また、基質溶液中に完全に溶けきれない不溶性基質を含有するものであってもよい。反応温度は酵素反応が進行する温度、すなわち55℃付近まで行えばよいが、好ましくは40乃至50℃の範囲を用いる。反応pHは、通常、5乃至10の範囲に調整すればよいが、好ましくは約pH6乃至8の範囲に調整する。反応時間は、酵素反応の進行具合により適宜選択すればよく、通常、基質固形物グラム当たり約0.1乃至100単位の酵素使用量で、0.1乃至100時間程度である。

【0035】原料基質からのトレハロース生成率については、比較的低DEで高分子の還元性澱粉部分分解物、すなわちグルコース重合度の高い還元性澱粉部分分解物からトレハロースを製造する場合、本発明による方法は、非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼとを用いる特願平4-362131号明細書に記載の方法と比較して、その生成率が顕著に増大する特長を有している。先願の非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼの反応によって得られるトレハロース生成率が約30%であるのに対して、本発明の非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを共に作用させる反応は、トレハロース生成率が約60%またはそれ以上の高率となる。

【0036】この作用の原理は、次の通りである。すなわち、まず、比較的グルコース重合度の高い還元性澱粉部分分解物が、非還元性糖質生成酵素によりその末端にトレハロース構造を有する1分子のグルコース重合度が同じ非還元性糖質に変換され、その非還元性糖質がトレハロース遊離酵素の加水分解反応により1分子のトレハロースとグルコース重合度で2を減少した1分子の還元性澱粉部分分解物とを生成する。新たに生成した還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が3以上であれば、

この還元性澱粉部分分解物が、更に、非還元性糖質生成酵素によりその末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換されるとともにトレハロース遊離酵素により1分子のトレハロースとグルコース重合度で2を減少した1分子の還元性澱粉部分分解物とを生成する。このように、非還元性糖質生成酵素の反応とトレハロース遊離酵素の反応とを繰り返すことにより、1分子の還元性澱粉部分分解物から複数分子のトレハロースとグルコース重合度が生成トレハロース分子数の2倍相当を減じた非還元性澱粉部分分解物とを生成させることができる。

【0037】この作用の方法は、グルコース重合度が3以上の還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素と本発明のトレハロース遊離酵素とを同時に作用させることも、また、該還元性澱粉部分分解物に、まず、非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いで、トレハロース遊離酵素を作用させることもできる。また、該両酵素を作用させた後、グルコアミラーゼを作用させてトレハロース生成率を更に高めることも有利に実施できる。

【0038】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

【0039】必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画、活性炭カラムクロマトグラフィーによる分画、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、アルカリ処理による還元性糖質の分解除去などの方法で精製することにより、最高純度のトレハロース製品を得ることも容易である。

【0040】このようにして得られた本発明のトレハロースを含む糖質を、必要により、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、トレハラーゼなどで加水分解したり、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼやグルコシルトランスフェラーゼなどで糖転移したりして、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶または無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0041】イオン交換カラムクロマトグラフィーとしては、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、

夾雑糖類を除去してトレハロース高含有画分を採取する方法が有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0042】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約60%以上、濃度約65乃至90%のトレハロース含有液を助晶缶にとり、0.1乃至20%の種晶共存下で、温度95℃以下、望ましくは、10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットからトレハロース含水結晶またはこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0043】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜(母液)とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度60乃至85%、晶出率20乃至60%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60乃至100℃の熱風で乾燥し、次いで30乃至60℃の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分10乃至20%、晶出率10乃至60%程度のマスキットを数時間乃至3日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎または切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で50乃至160℃、望ましくは80乃至140℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0044】このようにして製造される本発明のトレハロースは、還元力がなく、安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸またはアミノ基を含有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することも、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、それ自身が良質で上品な甘味を有している。更に、トレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫歯誘発菌などによって、酵酵されにくく、虫歯を起しにくい甘味料として利用できる。また、本発明の

トレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。

【0045】また、安定な甘味料であることより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他糖の晶出防止性、難消化性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0046】従って、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、嗜好物、飼料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0047】本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、果糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メイプルシュガー、エリスリトール、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種または2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0048】また、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0049】また、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0050】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0051】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリ

ン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、合成酒、洋酒などの酒類、紅茶、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0052】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤として有利に利用できる。

【0053】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適応できる。例えば、インターフェロン- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター- $\alpha$ 、- $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン2などのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナ

ゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、胎盤エキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ロイヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の健康食品や医薬品などを容易に製造できることとなる。

【0054】以上述べたような各種組成物にトレハロースを含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常、0.1%以上、望ましくは、1%以上含有せしめるのが好適である。

【0055】次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0056】まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産、精製およびその性質などを説明し、次いで、アルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素について同様に説明する。更に、公知微生物からのトレハロース遊離酵素について説明する。

#### 【0057】

【実験1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産】バインデックス#4（松谷化学工業株式会社製造）2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%および水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズM-11（FERM BP-4130）を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0058】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて殺菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1w/vを接種し、温度27℃、pHは6.0乃至8.0に保ちつつ、約72時間通気攪拌培養した。

【0059】培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.5単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約2単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液（pH7.0）で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.6単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.8単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.9単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素

活性が約1.2単位/ml認められた。

【0060】なお、非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v%（50mMリン酸緩衝液、pH7.0）4mlに酵素液を1ml加え40℃で60分間反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に10倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1μmolのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義した。

#### 【0061】

【実験2 酵素の精製】実験1の方法で得られた培養液約18lを超高圧菌体破碎装置ミニラボ（大日本製薬株式会社製）で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離（10,000rpm、30分間）することにより、約16lの遠心上清液を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離（10,000rpm、30分間）することにより上清を回収した。

【0062】更に、その液に硫酸を飽和度0.6になるように溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離（10,000rpm、30分間）して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離（10,000rpm、30分間）し、不溶物を除いた。その透析液（360ml）を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル（東ソー株式会社製造）を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行った。

【0063】本発明のトレハロース遊離酵素、非還元性糖質生成酵素ともDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから異なる食塩濃度においてそれぞれ溶出した。DEAE-トヨパールゲルからの溶出パターンを図1に示す。非還元性糖質生成酵素は食塩濃度約0.2Mで、トレハロース遊離酵素は食塩濃度約0.3Mで溶出し、それぞれの酵素活性画分を回収し、以下、両酵素を別々に精製した。

【0064】非還元性糖質生成酵素活性画分を2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離（10,000rpm、30分間）し不溶物を除き、得られる上清をブチルトヨパール 650ゲル（東ソー株式会社製造）を用いた疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行った。吸着した本酵素を2Mから0M硫酸のリニアグラジエントでカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、トヨパール HW-55樹脂（東ソー株式会社製造）を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行い、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。

【0065】トレハロース遊離酵素の精製は、DEAE-トヨパールカラムから溶出したトレハロース遊離酵素活性画分を用いて、上記の非還元性糖質生成酵素の精製方法と同様に、2M硫酸を含む緩衝液に対して透析し、次いで疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【0066】精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を、非還元性糖質生成酵素の場合は表1に、本発明のトレハロース遊離酵素の場合は表2に示す。

【0067】

【表1】

| 工程          | 非還元性糖質生成酵素<br>の活性量<br>(単位) | 比活性<br>(単位/mg蛋白) | 収率<br>(%) |
|-------------|----------------------------|------------------|-----------|
| 培養液         | 28,500                     |                  | 100       |
| 破碎後の上清      | 22,900                     | 0.12             | 80        |
| 硫酸塩析後の透析液   | 21,100                     | 0.43             | 74        |
| イオン交換カラム溶出液 | 15,200                     | 8.2              | 53        |
| 疎水カラム溶出液    | 7,950                      | 101              | 28        |
| ゲル濾過溶出液     | 5,980                      | 197              | 21        |

【0068】

【表2】

| 工程          | トレハロース遊離酵素<br>の活性量<br>(単位) | 比活性<br>(単位/mg蛋白) | 収率<br>(%) |
|-------------|----------------------------|------------------|-----------|
| 培養液         | 37,400                     |                  | 100       |
| 破碎後の上清      | 31,500                     | 0.17             | 84        |
| 硫酸塩析後の透析液   | 29,200                     | 0.60             | 78        |
| イオン交換カラム溶出液 | 25,400                     | 5.3              | 68        |
| 疎水カラム溶出液    | 18,700                     | 98.5             | 50        |
| ゲル濾過溶出液     | 11,600                     | 240              | 31        |

【0069】表1および表2の工程でそれぞれゲル濾過溶出液として得られた、精製非還元性糖質生成酵素標品および精製トレハロース遊離酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0070】

【実験3 トレハロース遊離酵素の性質】実験2の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約58,000乃至68,000ダルトンであった。

【0071】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル(2%アンフォライン含有、スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)を用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.3乃至4.3であった。

【0072】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図2(温度の影響)、図3(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、30分間反応で、45℃付近、至適p

Hは、40℃、30分間反応で、約6.0乃至7.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図4(温度安定性)、図5(pH安定性)に示した。本酵素の熱安定性は約40℃付近までであり、pH安定性は約5乃至10であった。

【0073】【実験4 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製】基質として用いる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質は、特願平4-362131号明細書に記載する方法に従って調製した。即ち、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースおよびマルトヘプタオースから選ばれる還元性澱粉部分分解物の20%水溶液に実験2の方法で得られた精製非還元性糖質生成酵素標品を基質固相物グラム当たりそれぞれ2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、常法に従って、加熱失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮し、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(XT-1016, Na<sup>+</sup>型、架橋度4%、東京有機化



学工業株式会社製造)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質の高純度標品を調製した。得られた高純度標品のうち、グルコシルトレハロース標品中のグルコシルトレハロースの純度は97.6%で、マルトシルトレハロース標品中のマルトシルトレハロースの純度は98.6%で、マルトリオシルトレハロース標品中のマルトリオシルトレハロースの純度は99.6%で、マルトテトラオシルトレハロース標品中のマルトテトラオシルトレハロースの純度は98.3%で、マルトペンタオシルトレハロース標品中のマルトペンタオシルトレハロースの純度は

98.1%であった。

【0074】上記5種の非還元性糖質(グリコシルトレハロース)の20%水溶液を調製し、それぞれに実験2で得られた精製トレハロース遊離酵素を基質固形物グラム当り2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、ワコービーズ WB-T-330カラム(和光純薬工業株式会社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。対照として、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースに精製トレハロース遊離酵素を同様に作用させ、高速液体クロマトグラフィーで分析した。それらの結果を表3に示す。

【0075】

【表3】

| 基質                  | 反応物                 | HPLC 溶出時間<br>(分) | 組成比<br>(%) |
|---------------------|---------------------|------------------|------------|
| グルコシル<br>トレハロース     | トレハロース              | 27.4             | 17.5       |
|                     | グルコース               | 33.8             | 8.5        |
|                     | グルコシル<br>トレハロース     | 23.3             | 76.0       |
| マルトシル<br>トレハロース     | トレハロース              | 27.4             | 44.3       |
|                     | マルトース               | 28.7             | 44.4       |
|                     | マルトシル<br>トレハロース     | 21.6             | 11.3       |
| マルトリオシル<br>トレハロース   | トレハロース              | 27.4             | 39.5       |
|                     | マルトリオース             | 25.9             | 60.0       |
|                     | マルトリオシル<br>トレハロース   | 19.7             | 0.5        |
| マルトテトラオシル<br>トレハロース | トレハロース              | 27.4             | 34.2       |
|                     | マルトテトラオース           | 24.1             | 65.5       |
|                     | マルトテトラオシル<br>トレハロース | 18.7             | 0.3        |
| マルトペンタオシル<br>トレハロース | トレハロース              | 27.4             | 29.1       |
|                     | マルトペンタオース           | 22.6             | 70.6       |
|                     | マルトペンタオシル<br>トレハロース | 17.8             | 0.3        |
| マルトリオース             | マルトリオース             | 25.9             | 100        |
| マルトテトラオース           | マルトテトラオース           | 24.1             | 100        |
| マルトペンタオース           | マルトペンタオース           | 22.6             | 100        |
| マルトヘキサオース           | マルトヘキサオース           | 21.8             | 100        |
| マルトヘプタオース           | マルトヘプタオース           | 21.0             | 100        |

【0076】表3の結果から明らかなように、

1. トレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度が1以上の還元性糖質とを生成する。

2. マルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用を受けない。

【0077】これらの結果から、本発明のトレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とその他のグリコシル部分との間の結合を極めて特異的に加水分解し、トレハロースを遊離する全く新しい作用機構の酵素であると判断される。

【0078】次いで、それぞれの反応物からトレハロースを精製するため、脱色、脱塩、濃縮し、アルカリ金属



型強酸性カチオン交換樹脂 (XT-1016) を用いたカラム分画を行い、トレハロース含量 97% 以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を濃縮して濃度約 65% にし、25℃ で 2 日間放置して含水トレハロース結晶を晶出させ、分蜜し、真空乾燥して、トレハロース含量 99% 以上の高純度標品を調製した。原料基質に対するそれぞれの収率は、固形物換算で、グルコシルトレハロースから 9.5%、マルトシルトレハロースから 14.9%、マルトトリオシルトレハロースから 16.0%、マルトテトラオシルトレハロースから 18.5%、マルトペンタオシルトレハロースから 17.7% であった。得られたそれぞれの高純度トレハロース標品を用いて、市販の試薬トレハロース (和光純薬工業株式会社販売) を標準品として、融点、融解熱、比旋光度、赤外線吸収スペクトル、粉末 X 線回折パターンおよびブタ腎臓由来トレハラーゼ (シグマ社販売) での分解性について比較したところ、調製したすべての高純度トレハロース標品は、融点  $97.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、融解熱  $57.8 \pm 1.2 \text{ KJ/mol}$ 、比旋光度  $+182 \pm 1.1^\circ$  で、試薬トレハロースの実測値とよく一致し、また、赤外線吸収スペクトルおよび粉末 X 線回折パターンについても、試薬トレハロースのスペクトルまたはパターンとよく一致した。更に、ブタ腎臓由来トレハラーゼ (シグマ社販売) によって、高純度トレハロース標品は試薬トレハロースと同様にグルコースに分解された。以上の結果から明らかなように、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質に本発明のトレハロース遊離酵素を作用させ生成した糖質はトレハロースであると確認された。

## 【0079】

【実験 5 還元性澱粉部分分解物からのトレハロースの調製】5% ワキシーコーンスターチ懸濁液を加熱糊化させた後、pH 4.5、温度 50℃ に調整し、これにイソアミラーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) を澱粉グラム当り 4,000 単位の割合になるように加え、20 時間反応させた。その反応液をオートクレーブ (120℃、10 分間) し、次いで 60℃ に冷却し、これをトヨパール HW-50S 樹脂 (東ソー株式会社製造) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル量 750m1) でグルコース重合度 3.5 乃至 10 の還元性澱粉部分分解物を調製した。

【0080】得られた還元性澱粉部分分解物、またはグルコース重合度 3 のマルトトリオースを、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 1% 濃度に調整し、これに実験 2 の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素標品および精製トレハロース遊離酵素標品をそれぞれ基質固形物当り 4 単位の割合で加え、40℃ で 24 時間作用させた後、一部を採り、脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。

【0081】残りの反応液は、更に、50℃、pH 4.5 に調整した後、グルコアミラーゼ (生化学工業株式会社製造) を基質固形物当り 50 単位の割合で加え、24 時間作用させ、同様に脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。それらの結果を表 4 に示す。

## 【0082】

## 【表 4】

| 還元性部分分解物の<br>グルコース重合度 | 反応物      | 組成比 ( % )                          |             |
|-----------------------|----------|------------------------------------|-------------|
|                       |          | 非還元性糖質生成酵素<br>およびトレハロース<br>遊離酵素反応後 | グルコアミラーゼ反応後 |
| 34. 1                 | トレハロース   | 80. 8                              | 83. 5       |
|                       | グルコース    | 0. 2                               | 18. 5       |
|                       | 還元性オリゴ糖  | 14. 4                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 4. 8                               | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |
| 28. 2                 | トレハロース   | 79. 7                              | 82. 5       |
|                       | グルコース    | 0. 2                               | 17. 5       |
|                       | 還元性オリゴ糖  | 15. 3                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 4. 8                               | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |
| 18. 1                 | トレハロース   | 77. 7                              | 80. 7       |
|                       | グルコース    | 0. 2                               | 19. 3       |
|                       | 還元性オリゴ糖  | 17. 0                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 5. 1                               | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |
| 15. 2                 | トレハロース   | 75. 0                              | 78. 5       |
|                       | グルコース    | 0. 3                               | 21. 5       |
|                       | 還元性オリゴ糖  | 18. 8                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 6. 1                               | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |
| 10. 0                 | トレハロース   | 66. 1                              | 70. 1       |
|                       | グルコース    | 0. 3                               | 29. 9       |
|                       | 還元性オリゴ糖  | 27. 6                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 7. 7                               | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |
| 3<br>( マルト<br>トリオース ) | トレハロース   | 4. 2                               | 20. 8       |
|                       | グルコース    | 2. 1                               | 79. 2       |
|                       | マルトトリオース | 85. 0                              | 0. 0        |
|                       | グリコシル    | 28. 7                              | 0. 0        |
|                       | トレハロース   |                                    |             |

( 注 ) 表中、グリコシルトレハロースは、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を意味する。

【0083】表4に示すように、非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させた後のトレハロース生成率は、グルコース重合度3のマルトトリオースでは4. 2%と幾分低い値であったが、グルコース重合度10乃至34. 1の澱粉部分分解物では66. 1乃至80. 8%の高い値が得られた。また、原料の還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が高い程、得られるトレハロース純度が高いことも判明した。更に、該酵素を作用させた反応液にグルコアミラーゼを作用させ、残存する末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質をトレハロースとグルコースとに分解することにより、生成するトレハロース純度が

より高まることも判明した。

#### 【0084】

【実験6 メイラード反応】実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99. 5%)の10%とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7. 0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、グルコース、マルトースを用いて、同様に処理し、480nmにおける吸光度を測定した。結果を表5に示す。

#### 【0085】

#### 【表5】

| 糖質標品         | 着色度 (480nm) |
|--------------|-------------|
| トレハロース (本発明) | 0.006       |
| グルコース (対照)   | 1.671       |
| マルトース (対照)   | 0.926       |

【0086】表5の結果から明らかなように、トレハロース標品は、メイラード反応による着色度は僅かであり、グルコースやマルトースの着色度の僅か0.4乃至0.6程度であり、本発明のトレハロース標品はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが半明した。従って、本糖質は、アミノ酸と混合しても、アミノ酸を損なうことが少ない糖質である。

#### 【0087】

【実験7 生体内での利用試験】厚治等が、『臨床栄養』、第41巻、第2号、第200乃至208頁(1972年)で報告している方法に準じて、実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)30gを20w/v%水溶液とし、これをボランティア6名(健康な26才、27才、28才、29才、30才、31才の男性)にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値およびインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値ともに、投与後、約0.5乃至1時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸收、代謝利用されて、エネルギー源になることが半明した。

#### 【0088】

【実験8 急性毒性試験】マウスを使用して、実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量

においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD50値は、50g/kg以上であった。

#### 【0089】

【実験9 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130)に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERM BP-4316)を用いた以外は、実験1と同様に、ファーメンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.3単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約1.8単位/mlであった。実験1と同様にして菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.5単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.5単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.8単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約1.3単位/ml認められた。

#### 【0090】

【実験10 酵素の精製】実験9の方法で得られた培養液約18lを用いて、実験2と同様の方法で精製した。精製の各工程結果は非還元性糖質生成酵素の場合は表6に、トレハロース遊離酵素の場合は表7にまとめた。

#### 【0091】

【表6】

| 工程          | 非還元性糖質生成酵素<br>の活性量<br>(単位) | 比活性<br>(単位/mg蛋白) | 収率<br>(%) |
|-------------|----------------------------|------------------|-----------|
| 培養液         | 23,700                     |                  | 100       |
| 破碎後の上清      | 22,400                     | 0.15             | 95        |
| 硫酸塩析後の透析液   | 20,200                     | 0.51             | 85        |
| イオン交換カラム溶出液 | 15,100                     | 6.5              | 64        |
| 疎水カラム溶出液    | 8,450                      | 115              | 36        |
| ゲル濾過溶出液     | 8,120                      | 217              | 26        |

#### 【0092】

【表7】

| 工程          | トレハロース遊離酵素<br>の活性量<br>(単位) | 比活性<br>(単位/mg蛋白) | 収率<br>(%) |
|-------------|----------------------------|------------------|-----------|
| 培養液         | 32,500                     |                  | 100       |
| 破碎後の上清      | 30,100                     | 0.19             | 93        |
| 硫酸塩析後の透析液   | 25,400                     | 0.72             | 78        |
| イオン交換カラム溶出液 | 22,700                     | 22.3             | 70        |
| 疎水カラム溶出液    | 15,200                     | 215              | 47        |
| ゲル濾過溶出液     | 11,600                     | 497              | 36        |

【0093】表6および表7の工程で、それぞれゲル濾過溶出液として得られた精製非還元性糖質生成酵素および精製トレハロース遊離酵素を、実験2の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた両精製酵素は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0094】

【実験11 酵素の性質】実験10の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素を、実験3の場合と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約57,000乃至67,000ダルトンであった。また、本酵素の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、等電点は3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、および本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験3の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図6に、pHの影響を図7に、温度安定性を図8に、pH安定性を図9に示した。

【0095】図から明らかなように酵素の至適温度は45℃付近、至適pHは約6.0乃至7.5である。温度安定性は45℃付近までであり、pH安定性は約5.0乃至10.0である。

【0096】【実験12 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのト

レハロースの調製】実験10の方法で得られた精製酵素を用いて、実験4の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0097】

10 【実験13 公知微生物からのトレハロース遊離酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明のトレハロース遊離酵素産生能の確認されたブレヴィバクテリウム・ヘロボルムATCC11822およびマイクロコッカス・ロゼウスATCC186を、実験1の場合と同様にファーメンターで27℃で72時間培養した。それぞれの培養液約181を用いて、実験2の場合と同様に、培養液を破碎装置で処理し、その遠心上清を回収し、続いて、硫酸塩析、透析、イオン交換カラムクロマトグラフィーし、得られた部分精製酵素標品の性質を調べた。これらの結果を、前述のリゾビウム・スピーシーズ M-11およびアルスロバクター・スピーシーズ Q36の場合とともに表8にまとめた。

#### 【0098】

##### 【表8】

| 微生物名                              | イオン交換カラム<br>溶出液 (単位) | 至適温度  | 至適pH      | 温度安定性   | pH安定性      |
|-----------------------------------|----------------------|-------|-----------|---------|------------|
| ブレヴィバクテリウム・<br>ヘロボルム<br>ATCC11822 | 6,070                | 40℃付近 | 約6.5乃至8.8 | 40℃付近まで | 約5.5乃至9.5  |
| マイクロコッカス・<br>ロゼウス<br>ATCC186      | 3,010                | 35℃付近 | 約6.8      | 30℃付近まで | 約6.5乃至7.2  |
| リゾビウム・<br>スピーシーズ<br>M-11          | 25,400               | 45℃付近 | 約6.0乃至7.5 | 40℃付近まで | 約5.0乃至10.0 |
| アルスロバクター・<br>スピーシーズ<br>Q36        | 22,700               | 45℃付近 | 約6.0乃至7.5 | 45℃付近まで | 約5.0乃至10.0 |

【0099】また、これらの公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験12の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズM-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0100】

【実験14 トレハロース遊離酵素の部分アミノ酸配列】

#### (1) N末端アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の精製酵素標品および実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約80μgをN末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー モデル473A (アプライドバイオシステムズ社製造、米国)を用い、N末端から10残基まで分析した。それぞれ得られたN末端配列を表9に示す。

#### 50 【0101】

【表9】

| 由来微生物                      | N末端アミノ酸配列  |
|----------------------------|--|
| リゾビウム・<br>スピーシーズ<br>M-11   | アラニン-リジン-プロリン-バリン-グルタ<br>ミン-グリシン-アラニン-グリシン-アルギ<br>ニン-フェニルアラニン  |
| アルスロバクター・<br>スピーシーズ<br>Q36 | トレオニン-プロリン-トレオニン-チロシン<br>-プロリン-アルギニン-グルタミン酸-アル<br>ギニン-アラニン-リジン |

【0102】表9から明らかなように、N末端アミノ酸は、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来酵素の場合アラニンで、それに続くアミノ酸配列は、リジン-プロリン-バリン-グルタミン-グリシン-アラニン-グリシン-アルギニン-フェニルアラニンであることが判明した。一方、アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来酵素の場合、そのN末端アミノ酸はトレオニンであり、それに続くアミノ酸配列は、プロリン-トレオニン-チロシン-プロリン-アルギニン-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-リジンであることが判明した。

#### 【0103】(2) 内部部分アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の精製酵素標品および実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ10mMトリス・塩酸緩衝液(pH9.0)に対して透析した後、同緩衝液で約1mg/mlの濃度になるように希釈した。これら試料液(1ml)それぞれに10μgのリジレンドペプチダーゼ(和光純薬株式会社販売)を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行った。リゾビウム・スピーシーズ M-11由来酵素の場合、カプセルパックC18カラム(直径4.6mm×長さ250mm、株式会社資生堂製造)を用い、流速0.6ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-16v

／v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-48v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来酵素の場合、マイクロボンダパックC18カラム(直径2.1mm×長さ150mm、ウオーターズ社製造、米国)を用い、流速0.9ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-30v/v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-55v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。カラムから溶出したペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離したそれぞれ3ペプチド[リゾビウム属酵素由来ペプチド、RT41(保持時間約41分)、RT46(保持時間約46分)、RT54(保持時間約54分);アルスロバクター酵素由来ペプチド、AT7(保持時間約7分)、AT30(保持時間約30分)、AT48(保持時間約48分)]を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200μlの0.1v/v%トリフルオロ酢酸-50v/v%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ10残基までアミノ酸配列を分析した。得られた部分内部配列を表10に示す。

#### 【0104】

#### 【表10】

| 由来微生物                          | ペプチド名 | 内部部分アミノ酸配列   |
|--------------------------------|-------|--|
| リゾビウム・<br>スピーシーズ<br>M-11       | RT41  | ヒスチジン-グリシン-グルタミン酸-グリシン-<br>-アスパラギン-トレオニン-トリプトファン-<br>グリシン-アスパラギン酸-セリン  |
|                                | RT48  | アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-ア<br>ラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロ<br>イシン-グルタミン酸-グルタミン酸  |
|                                | RT54  | ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-ア<br>ラニン-グルタミン酸-アラニン-セリン-アラ<br>ニン-グリシン-アスパラギン酸    |
| アルスロバク<br>ター・スピー<br>シーズ<br>Q36 | AT30  | グルタミン-グリシン-グルタミン酸-グリシン-<br>-アスパラギン-トレオニン-トリプトファン-<br>グリシン-アスパラギン酸-セリン  |
|                                | AT48  | アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-ア<br>ラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロ<br>イシン-グルタミン酸-アスパラギン酸 |
|                                | AT7   | ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-ア<br>ラニン-グルタミン酸-アラニン-アラニン-グ<br>ルタミン酸-グリシン-アスパラギン酸 |

【0105】表10から明らかなように、リゾビウム・スピーシーズ M-11 酵素のペプチド RT41 の配列と、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 酵素のペプチド AT30 とは分析した10残基中の9残基が一致し、ペプチド RT46 とペプチド AT48 も分析した10残基中の9残基が一致し、また、ペプチド RT54 とペプチド AT7 とでは8残基が一致した。このことから、リゾビウム属に属する微生物由来の酵素とアルスロバクター属に属する微生物由来の酵素間においては、内部部分アミノ酸配列に高い相同性を有すると判断され、これらの内部部分アミノ酸配列を、ロイシン-アスパラギン-トリプトファン-アラニン-グルタミン酸-アラニン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-グリシン-アスパラギン酸（但し、X<sub>1</sub>はセリンまたはアラニンを意味し、X<sub>2</sub>はアラニンまたはグルタミン酸を意味する。）、および、アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロイシン-グルタミン酸-X<sub>3</sub>（但し、X<sub>3</sub>はグルタミン酸またはアスパラギン酸を意味する。）、更に、X<sub>4</sub>-グリシン-グルタミン酸-グリシン-アスパラギン-トレオニン-トリプトファン-グリシン-アスパラギン-セリン（但し、X<sub>4</sub>はヒスチジンまたはグルタミンを意味する。）と表すことができる。

【0106】以下、本発明のトレハロース遊離酵素の製造方法とそれを利用したトレハロースおよびそれを

含む糖質を含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

#### 【0107】

【実施例A-1】リゾビウム・スピーシーズ M-11（FERM BP-4130）を実験1の方法に準じて、ファーメンターで約80時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約181の培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素（17.2単位/ml）とトレハロース遊離酵素（20.8単位/ml）とを含む濃縮酵素液約11を回収した。

【0108】15%とうもろこし澱粉乳に最終濃度0.1重量%となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH6.0に調整し、これにα-アミラーゼ（ノボ社製造、商品名ターマミール60L）を澱粉グラム当り0.2重量%になるよう加え、95℃で15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ（2kg/cm<sup>2</sup>）を30分間行った後、45℃に冷却し、これにプルナーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉グラム当り1,000単位、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り0.2mlの割合になるよう加え、48時間反応させた。その反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%のシラップを固形物当り約92%で得た。

【0109】本品は固形物当りトレハロースを70.2%、グルコシルトレハロースを2.4%、マルトシルトレハロースを3.3%、グルコースを0.7%、マルトースを10.1%、マルトリオースを12.9%およびマルトテトラオース以上のマルトオリゴ糖を0.4%含有しており、まろやかで上品な甘味、低い還元性、低い粘度、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0110】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得られた糖液を原糖液とし、トレハロースの含量を高めるため、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(XT-1016、Na<sup>+</sup>型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製造)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付ステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、マルトースおよびマルトリオースなどの夾雑糖類を除去し、トレハロース高含有画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、トレハロース高含有粉末を固形物当り約56%の収率で得た。本品はトレハロースを約97%含有しており、極めて低い還元性、まろやかで上品な甘味を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0111】

【実施例A-3】実施例A-2の方法で得られたトレハロース高含有画分を、常法に従って、活性炭で脱色しイオン交換樹脂により脱塩して精製した溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm<sup>2</sup>の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して固形物当り約90%の収率で得た。

【0112】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0113】

【実施例A-4】実施例A-2の方法で得られたトレハ

ロース高含有画分を、実施例A-3と同様に精製し、次いで蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約3.0%のシラップとした。次いで、助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当り1%加え、120℃で5分間攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、100℃で6時間晶出熟成させてブロックを調製した。

【0114】次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して、水分0.3%の無水結晶トレハロース粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して固形物当り約85%の収率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、または加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0115】

【実施例A-5】リゾビウム・スピーシーズ M-11(FERM BP-4130)の変異株を実施例A-1の方法に準じて、ファーメンターで約70時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約100lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素(約410単位/ml)とトレハロース遊離酵素(約490単位/ml)とを含む濃縮酵素液約5lを回収した。

【0116】6%馬鈴薯澱粉乳を加熱糊化させた後、pH4.5、温度50℃に調整し、これにイノアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当り500単位の割合になるよう加え、20時間反応させた。その反応液をpH6.5に調整し、オートクレーブ(120℃)を10分間行い、次いで95℃に冷却し、これにα-アミラーゼ(ノボ社製造、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当り0.1%重量部の割合になるよう加え、15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ(130℃)を30分間行った後、45℃に冷却し、これに前記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り0.01mlの割合になるよう加え、64時間反応させた。その反応液を95℃で10分間保った後、50℃、pH5.0に調整し、グルコアミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム)を澱粉グラム当り10単位加えて40時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩し、濃度約60%に濃縮した。本糖液中には固形物当り80.5%のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度約84%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて攪拌助晶し、次いで、プラスチック製バットに取り出し、室温で3日間放置し晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料澱粉に対

して固形物当り約90%の収率で得た。

【0117】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0118】

【実施例A-6】アルスロバクター・スピーシーズ Q 36 (FERM BP-4316) を実験9の方法に準じて、ファーマンターで約72時間培養した。培養液を遠心分離(10,000rpm、30分間)して除菌した後、UF膜で濃縮し、非還元性糖質生成酵素(16.3単位/ml)とトレハロース遊離酵素(25.1単位/ml)とを含む濃縮液約11を回収した。

【0119】馬鈴薯澱粉1重量部に水6重量部と $\alpha$ -アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名ネオスピターゼ)0.01重量部とを加え、攪拌混合し、この懸濁液のpHを6.2に調整した後、85乃至90℃に保ち、澱粉の糊化・液化を行い、その液化液を120℃で10分間加熱して $\alpha$ -アミラーゼを失活させた後、45℃に冷却し、これにイソアミラーゼ(林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当り500単位、および上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り0.2mlの割合になるように加え48時間反応させた。その反応液を95℃で10分間加熱して酵素を失活させた後、50℃、pH5.0に調整し、グルコアミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム)を澱粉グラム当り10単位加えて40時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩し、濃度約60%に濃縮した。本糖液中には固形物当り78.3%のトレハロースを含有していた。イオン交換樹脂として、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(オルガノ株式会社販売、商品名CG6000、Na<sup>+</sup>型)を用いた以外は、実施例A-2の方法に従ってイオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当り約95%のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度75%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて攪拌助晶し、次いで、プラスチック製バットに取り出し、室温で3日間放置し晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料澱粉に対して固形物当り約70%の収率で得た。

【0120】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0121】

【実施例A-7】ブレバクテリウム・ヘロボルム A

TCC11822を実験13の方法に準じて、ファーマンターで約72時間培養し、培養液を破碎装置で処理し、その処理液を遠心分離(10,000rpm、30分間)して残渣を除いた後、UF膜で濃縮し、非還元性糖質生成酵素(約8単位/ml)とトレハロース遊離酵素(約12単位/ml)とを含む濃縮液約700mlを回収した。

【0122】33%タピオカ澱粉乳に最終濃度0.1%となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH6.0に調整し、これに $\alpha$ -アミラーゼ(ノボ社製造、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当り0.3%になるよう加え、95℃で20分間反応させた。その反応液をオートクレーブ(2kg/cm<sup>2</sup>)を30分間行った後、40℃に冷却し、これにイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当り200単位、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り0.2mlの割合になるように加え、48時間反応させた。その反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%のシラップを固形物当り約90%で得た。

【0123】本品は固形物当りトレハロースを60.1%、グルコシルトレハロースを1.4%、マルトシルトレハロースを1.5%、グルコースを1.0%、マルトースを6.5%、マルトトリオースを8.3%およびマルトテトラオース以上のマルトオリゴ糖を21.2%含有しており、まろやかで上品な甘味、低い還元性、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0124】

【実施例A-8】実施例A-6の方法で得たトレハロース含量約95%のトレハロース高含有液を常法にしたがって、脱色、脱塩した。本溶液を濃度約75%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて50℃とし、ゆっくり攪拌しつつ徐冷して、25℃まで下げ、バスケット型遠心分離機で分離し、結晶を少量の水でスプレーし、洗浄して、純度99%以上の高純度トレハロース含水結晶を収率約50%で得た。

【0125】

【実施例B-1 甘味料】実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末1重量部に、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド(東洋精糖株式会社販売、商品名 $\alpha$ Gスイート)0.01重量部およびL-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル(商品名アスパルテム)0.01重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の



約2.5倍の甘味度を有し、甘味度当りカロリーは、蔗糖の約1/2.5に低下している。

【0126】本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。

【0127】また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0128】

【実施例B-2 ハードキャンディー】濃度5.5%蔗糖溶液100重量部に実施例A-7の方法で得たトレハロース含有シラップ30重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。

【0129】本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出も起こらない高品質のハードキャンデーである。

【0130】

【実施例B-3 チューインガム】ガムベース3重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部および実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶3重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。

【0131】本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

【0132】

【実施例B-4 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップ3重量部および蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。

【0133】本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0134】

【実施例B-5 乳酸菌飲料】脱脂粉乳17.5重量部、実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップ130重量部および特開平4-281795号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末50重量部を水1,150重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部接種し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。

【0135】本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0136】

【実施例B-6 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。

【0137】本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0138】

【実施例B-7 カスタードクリーム】コーンスターチ100重量部、実施例A-7の方法で得たトレハロース含有シラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部および食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。

【0139】本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0140】

【実施例B-8 ういろうの素】米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、蔗糖40重量部、実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末80重量部およびプルラン4重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。

【0141】本品は、照り、口当りも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0142】

【実施例B-9 あん】原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、洗切り、あく抜きし、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップ5重量部および水4重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。

【0143】本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、水菓などのあん材料として好適である。

【0144】

【実施例B-10 パン】小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-3の方法で得たトレハロース含有粉末1重量部および無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。

【0145】本品は、色相、すだちともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0146】

【実施例B-11 ハム】豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部および硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-6の方法で得たトレハロース含水結晶粉末40重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。

【0147】本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0148】

【実施例B-12 粉末ペプチド】40%食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社製造、商品名ハイニース）1重量部に、実施例A-6の方法で得たトレハロース含水結晶粉末2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。

【0149】本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0150】

【実施例B-13 粉末味噌】赤味噌1重量部に実施例A-4の方法で得た結晶性無水トレハロース粉末3重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一晩静置して固化し、離型して1個当たり約4gの固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。

【0151】本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。

【0152】また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

【0153】

【実施例B-14 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得られる液状卵黄1重量部に対して、実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末4重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

【0154】本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動

食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0155】

【実施例B-15 化粧品用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末2重量部、 $\alpha$ -グリコシルルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリン10重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部および精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

【0156】本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0157】

【実施例B-16 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス0.5重量部に実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末1.5重量部を混捏した後、バットに移し、2日間放置してトレハロース含水結晶に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。

【0158】本品を適量のビタミンB1およびビタミンB2粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。

【0159】本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【0160】

【実施例B-17 固体製剤】ヒト天然型インターフェロン- $\alpha$ 標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン- $\alpha$ 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン- $\alpha$ を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを索通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロン- $\alpha$ を実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約20倍量の無水結晶マルトース粉末（株式会社林原商事販売、商品名ファイントース）に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1錠（約200mg）当たりヒト天然型インターフェロン- $\alpha$ を約150単位含有する錠剤を得た。

【0161】本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利

に利用できる。本品は、トレハロースと共にマルトースが安定剤として作用し、室温でも放置してもその活性を長期間よく維持する。

#### 【0162】

【実施例B-18 糖衣錠】重量150mgの素錠を芯剤とし、これに実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末40重量部、プルラン（平均分子量20万）2重量部、水30重量部、タルク25重量部および酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量配合

|                        |       |
|------------------------|-------|
| 第2リン酸カルシウム             | 45.0% |
| プルラン                   | 2.95% |
| ラウリル硫酸ナトリウム            | 1.5%  |
| グリセリン                  | 20.0% |
| ポリオキシエチレンソルビタンラウレート    | 0.5%  |
| 防腐剤                    | 0.05% |
| 実施例3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 | 12.0% |
| マルチトール                 | 5.0%  |
| 水                      | 13.0% |

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。

【0165】本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

#### 【0166】

【実施例B-20 流動食用固体製剤】実施例A-6の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末500重量部、粉末卵黄270重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.8重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

【0167】本品は、1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

#### 【0168】

【実施例B-21 輸液剤】実施例A-8の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約10w/v%に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してパイロジェンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。

【0169】本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度10w/v%で血液と等張で、グルコースの場合の2倍濃度でエネルギー補給できる。

#### 【0170】

【実施例B-22 輸液剤】実施例A-8の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ

が約230mgになるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末65重量部、プルラン1重量部および水34重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。

【0163】本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

#### 【0164】

【実施例B-19 練歯磨】

20 酸配合物とがそれぞれ5w/v%、30w/v%になるように水に混合溶解し、次いで実施例10と同様に精製してパイロジェンフリーとし、更に、プラスチック製パックに充填し施栓して製品を得た。

#### 【0171】

アミノ酸配合物の組成 (mg/100ml)

|               |     |
|---------------|-----|
| L-イソロイシン      | 180 |
| L-ロイシン        | 410 |
| L-リジン塩酸塩      | 620 |
| L-メチオニン       | 240 |
| 30 L-フェニルアラニン | 290 |
| L-スレオニン       | 180 |
| L-トリプトファン     | 60  |
| L-バリン         | 200 |
| L-アルギニン塩酸塩    | 270 |
| L-ヒスチジン塩酸塩    | 130 |
| グリシン          | 340 |

【0172】本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

#### 【0173】

【実施例B-23 外傷治療用膏薬】実施例A-2の方法で製造したトレハロース高含有粉末200重量部およびマルトース300重量部に、ヨウ素3重量部を溶解したメタノール50重量部を加え混合し、更に10w/v%プルラン水溶液200重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。

【0174】本品は、ヨウ素による殺菌作用のみなら

ず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治療期間が短縮され、創面もきれいに治る。

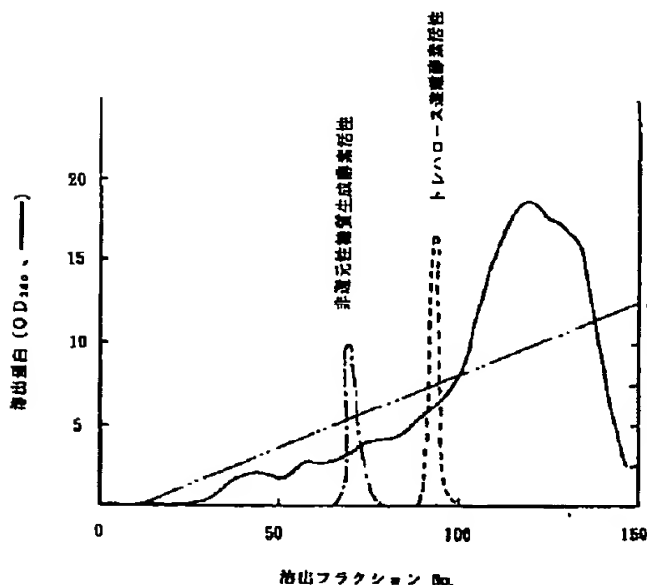
#### 【0175】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の新規トレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離し、また、還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素とともに作用させることによって、高収率でトレハロースを生成する。そのトレハロースの分離、精製も容易であり、このようにして得られるトレハロースおよびそれを含む糖質は安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。また、輸液剤などとして非経口的に使用され、よく代謝利用される。トレハロースおよびそれを含む糖質は甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0176】従って、本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉に由来する澱粉部分分解物から、従来、望むべくして容易に得られなかったトレハロースおよびそれを含む糖質を工業的に大量かつ安価に供給できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響の大きさは、澱粉科学、酵素科学、生化学などの学問分野は言うに及ばず、産業界、とりわけ食品、化粧品、医薬品分野は勿論のこと、農水畜産業、化学工業にも及び、これら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】



【図1】DEAE-トヨパールからの本発明のトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素の溶出パターンを示す図である。

【図2】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図3】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図4】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図5】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

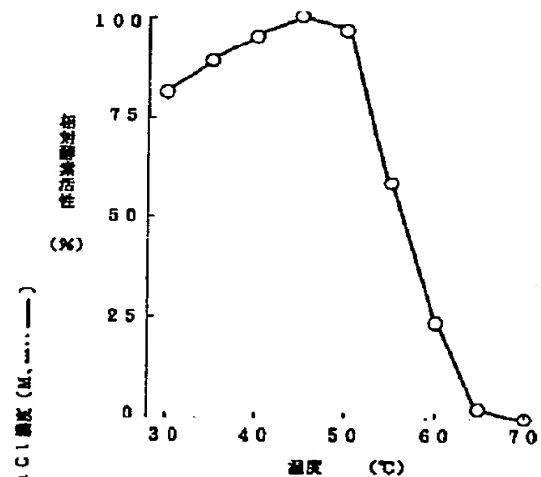
【図6】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図7】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

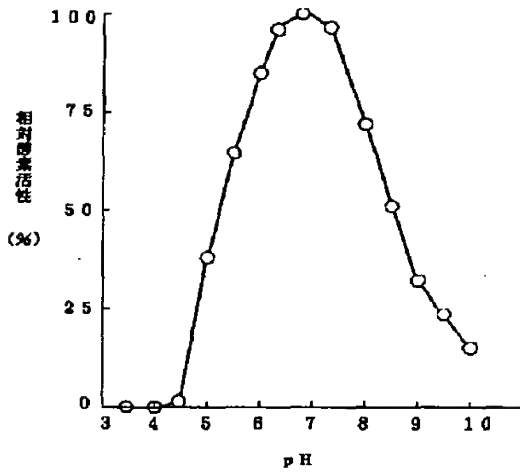
【図8】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図9】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

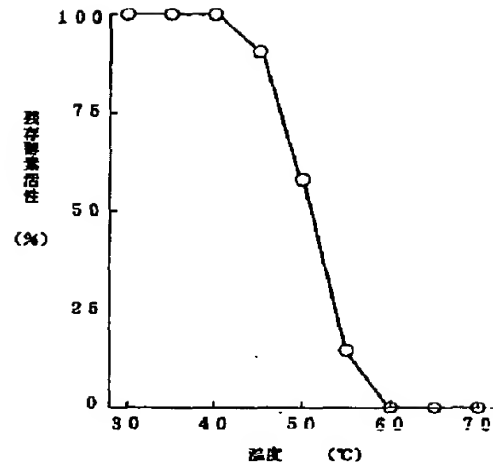
【図2】



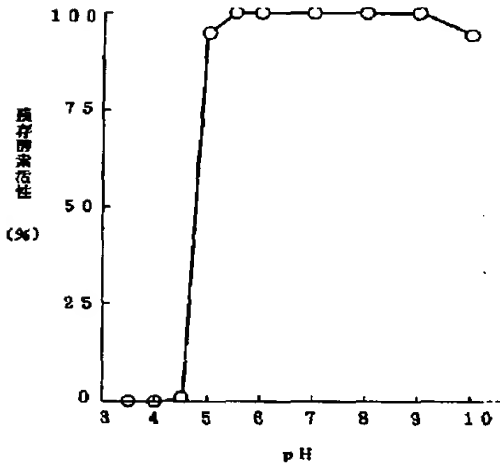
【図3】



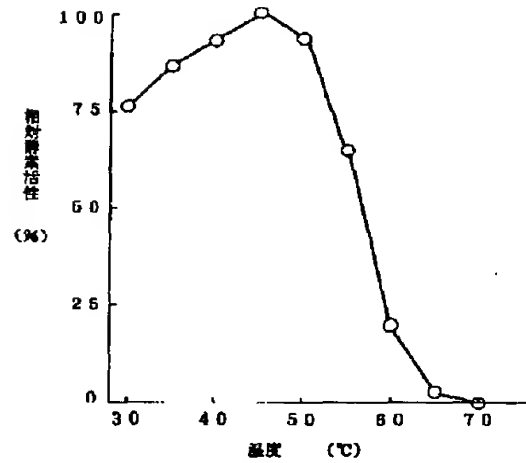
【図4】



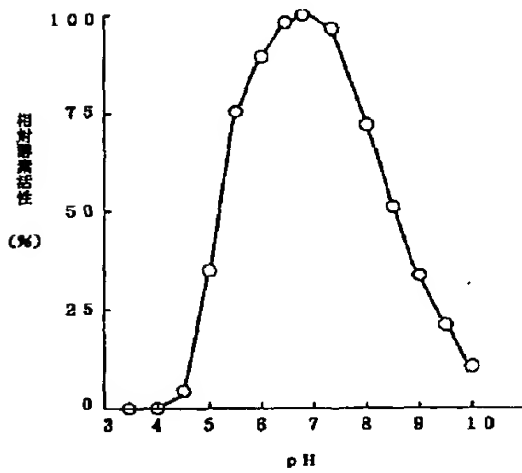
【図5】



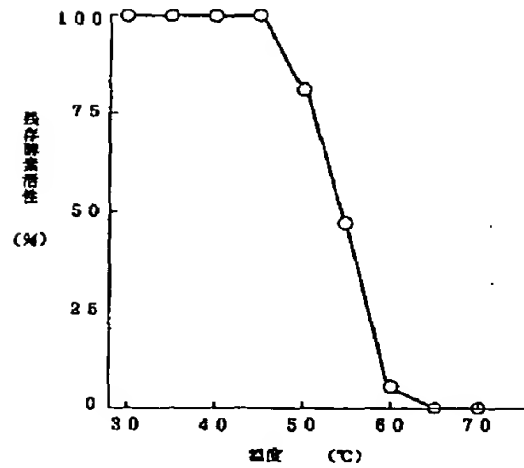
【図6】



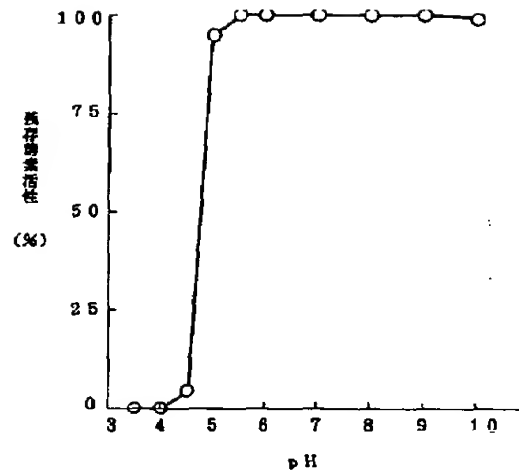
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12N 9/24  
C12R 1:06 )  
(C12N 9/24  
C12R 1:13 )  
(C12N 9/24  
C12R 1:265 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:41 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:265 )

A

A